

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Abteilung Medizinische Zellbiologie

– Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Philipps



**Universität
Marburg**

**Überprüfung des Drug Delivery Konzepts von
„Lipid-Nucleosid- und Polysaccharid-Konjugaten
von 5-Fluorouracil“**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Anisa Farhat aus Frankfurt am Main

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
14.07.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H.Schäfer
Referent: Herr Prof. Dr. R.Kinscherf
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Grosse
2. Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Burchert

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Hintergrund	1
1.1	Fluoropyrimidine	1
1.2	Krebsmortalität	4
1.3	Kolorektales Karzinom (KRK)	6
1.3.1	Definition	6
1.3.2	Pathogenese	6
1.3.3	Risikofaktoren	7
1.3.4	Vorsorge	7
1.3.5	Klinik	8
1.3.6	Diagnostik und Staging	8
1.3.7	Therapie	11
1.3.8	Prognose und Nachsorge	14
2	Fragestellung	16
3	Material	19
3.1	Chemikalien	19
3.2	Zelllinien	23
3.3	Einmalmaterial	24
3.4	Geräte	25
3.5	Programme und Software	26
4	Methoden	27
4.1	Zellkultur	27
4.1.1	Zelllinien	27
4.1.2	Kulturbedingungen	27
4.2	Verwendete Substanzen	29
4.3	Intrazelluläre Lokalisation der ATTO 425 [®] markierten Substanzen	31
4.4	Viabilität-Assay	31
4.5	Apoptose-Assay	33

4.6	Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	34
4.6.1	RNA-Isolierung	34
4.6.2	Kontrolle der RNA-Qualität und -Integrität	35
4.6.3	Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA)	37
4.6.4	Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	38
4.7	Statistische Auswertung	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Intrazelluläre Lokalisation der ATTO 425 [®] markierten Substanzen	42
5.2	Viabilität-Assay	43
5.2.1	Viabilität der HT-29-Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit den Substanzen 1, 2a, 3a-7a bzw. 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)	43
5.2.2	Viabilität der HT-29-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit den Substanzen 2c, 3b-7b in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (2c) und Negativkontrolle (100% Viabilität)	49
5.2.3	Viabilität der RENCA-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Substanzen 1, 2a, 3a-7a und 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)	51
5.2.4	Viabilität der HepG2-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Substanzen 1, 2a, 3a-7a und 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)	53
5.2.5	Viabilität der THP-1-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Substanzen 1, 3a-7a und 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)	55
5.3	Apoptose-Assay	57
5.4	Real-time PCR	61

6	Diskussion	65
7	Zusammenfassung	73
8	Summary	76
9	Abkürzungsverzeichnis	79
10	Abbildungsverzeichnis	81
11	Tabellenverzeichnis	85
12	Literaturverzeichnis	86
13	Veröffentlichungen	103
14	Verzeichnis akademischer Lehrer	104
15	Danksagung	105

1 Einleitung und Hintergrund

1.1 Fluoropyrimidine

In den 1950ern wurde 5-Fluorouracil (5-FU) von Charles Heidelberger et al. erfunden (Heidelberger et al. 1957) mit dem Ziel, die Nucleinbiosynthese der Tumorzellen mit diesem Analogon beeinflussen zu können. Die Herstellung von 5-FU basierte auf den Erkenntnissen einer Studie, die feststellte, dass Hepatomzellen in Ratten einen höheren Verbrauch der Pyrimidinbase Uracil hatten, als andere Zellen (Rutman et al. 1954).

5-FU ist ein Uracil-Analogon, das an der C5-Position ein Fluoratom anstelle eines Wasserstoffatoms trägt (Abb. 1) (Duchinsky et al. 1957).

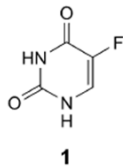


Abbildung 1: Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU; 1) (Duchinsky et al. 1957)

In den darauffolgenden Untersuchungen zeigten sich Anzeichen für die Wirkmechanismen der Fluoropyrimidine (Bosch et al. 1958, Chaudhuri et al. 1958, Dannberg et al. 1958), die durch neue Untersuchungsmethoden heute besser verstanden, aber noch nicht vollständig geklärt sind. 5-FU wird weit verbreitet in der Therapie solider Tumore eingesetzt. Es findet unter anderem Anwendung in der Therapie des Magenkarzinoms, des kolorektalen Karzinoms und des Mamma-Karzinoms (Bodner-Adler et al. 2007, Carrato 2008, Khosravi Shahi et al. 2007). Die Zellen nehmen 5-FU auf und setzen es zur Synthese von Desoxyuridin- und Urdinsäure (FdUMP bzw. FUMP) ein, welche in die Nucleinsäuren, DNA und RNA, eingebaut werden (Marin-Vicente et al. 2013).

5-FU (1) wird in mehrere aktive Metabolite umgewandelt: Die drei Hauptmetabolite sind Fluorodeoxyuridin Monophosphat (FdUMP), Fluorodeoxyuridin Triphosphat (FdUTP) und Fluorouridin Triphosphat (FUTP) (Longley et al. 2003).

Der 5-FU Metabolit FdUMP bindet zusammen mit 5,10-Methylen tetrahydrofolat (CH_2THF) an die Thymidylat-Synthase (TS) und hemmt diese irreversibel (Abb. 2) (Sommer & Santi 1974). Dadurch wird die Neusynthese von dTMP (Desoxythymidin Monophosphat) aus dUMP (Desoxyuridin Monophosphat) unterbrochen (Grogan et al. 2011). Die Funktion der TS ist essentiell für die ausgewogene Versorgung der Zelle mit

den vier DNA-Vorstufen, die für die normale DNA-Replikation benötigt werden (Kaneda et al. 1990). Als Folge der Unterbrechung der dTMP-Synthese erfolgt ein Ungleichgewicht der Desoxynukleotide (Jackson, R. C. & Grindley, G. B. 1984), vor allem des dATP/dTTP-Verhältnisses (Houghton et al. 1995). Man nimmt an, dass dieses Ungleichgewicht zu Strangbrüchen in der DNA führt und den Zelltod zur Folge hat (Houghton et al. 1995, Yoshioka et al. 1987). Durch die TS-Inhibition akkumuliert dUMP und führt so zu einem erhöhten dUTP-Spiegel in der Zelle (Aherne et al. 1996). Sowohl dUTP, als auch der 5-FU Metabolit FdUTP können fälschlicherweise in die DNA eingebaut werden und zu DNA-Schäden führen (Grogan et al. 2011, Longley et al. 2003). Das Enzym UGD (Uracil-DNA-Glycosylase) (Lindahl 1974) versucht diese fälschlicherweise eingebauten Bausteine wieder aus der DNA zu entfernen. Doch durch das hohe dUTP/dTTP-Verhältnis werden nur noch mehr falsche Metabolite in die DNA eingebaut, die zu weiteren Schäden führen (Longley et al. 2003).

Es wird angenommen, dass der Schaden in humanen Zellen, der durch die Chemotherapeutika (z.B. durch 5-FU) ausgelöst wird, auch vom Weg des programmierten Zelltodes (Apoptose) abhängig ist (Lowe et al. 1993) .

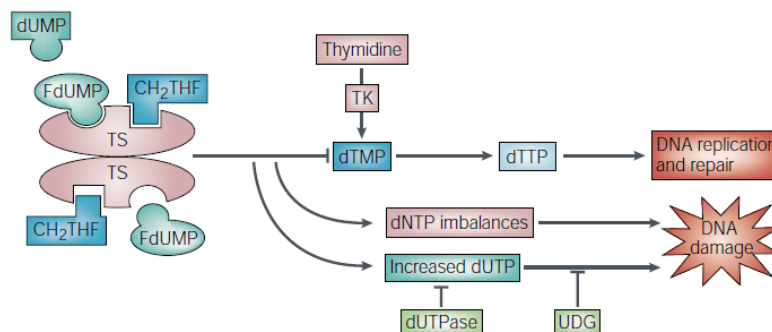


Abbildung 2: Mechanismus der Hemmung der Thymidylat-Synthase (TS) durch 5-FU, CH₂THF= 5,10-Methylentetrahydrofolat, dNTP= Deoxynucleotid, dTMP= Desoxythymidin Monophosphat, dUMP= Desoxythymidin Monophosphat, dUTP= Deoxyuridin Triphosphat, dUTPase= Deoxyuridin Triphosphat Pyrophosphatase, FdUMP= Fluorodeoxyuridin Monophosphat, UGD= Uracil-DNA Glykosylase (Longley et al. 2003)

Durch die zusätzliche Gabe von Leucovorin (LV) zu 5-FU kann eine verbesserte Wirkung von 5-FU beobachtet werden (Wolpin & Mayer 2008, Zhang et al. 1992). Diese entsteht zum einen durch den Anstieg des CH₂HF-Spiegels nach LV-Gabe (CH₂HF ist für die optimale Bindung von FdUMP an die TS notwendig) (Wright et al.

1989), und zum anderen verbessert es die Stabilität der Bindung von FdUMP an die TS (Park et al. 1988).

Eine vermehrte Expression der TS in Tumorzellen kann die Wirkung von 5-FU über die TS-Hemmung aufheben. In Tumorzellen mit einer Resistenz gegen 5-FU wurden erhöhte TS-Werte gefunden (Copur et al. 1995, Johnston et al. 1992). Auch die Behandlung mit 5-FU selbst führt, durch den Wegfall des negativen Feed-back Mechanismus des ungebundenen Enzyms auf seine eigene Expression, zu einer erhöhten Expression der TS (Chu et al. 1994, Swain et al. 1989). Ein weiterer Wirkmechanismus von 5-FU in der Zelle ist der Einbau des Metaboliten FUTP in die RNA und seltener auch in die DNA (Pettersen et al. 2011). Dieser Einbau unterbindet die normale RNA Funktion und dadurch wird die Zellteilung gestört (Kufe & Major 1981). Der fehlerhafte Einbau der 5-FU Metabolite kann auf mehreren Ebenen die normale RNA Funktion stören: So wird z. B. das Splicing der prä-mRNA gehemmt (Doong & Dolnick 1988), aber auch die Funktionen der tRNA und der snRNA (Patton 1993) werden gestört (Santi & Hardy 1987).

Die therapeutische Breite von 5-FU ist schmal und seine Halbwertszeit im Blut und Körpergewebe, die im Bereich von Minuten liegt (Cheng et al. 2012), ist nur sehr kurz. Der rasche Abfall der Konzentration ist vor allem auf den schnellen Abbau von 5-FU in der Leber zurückzuführen: Mehr als 80% werden durch das Enzym Dihydropyrimidin Dehydrogenase abgebaut (Diasio & Harris 1989).

Die klinische Anwendbarkeit der Chemotherapie wird auch durch die Nebenwirkungen der Chemotherapeutika begrenzt (Cheng et al. 2012, Kodama et al. 2008). Nebenwirkungen könnten durch hohe Blutkonzentrationen und eine unspezifische systemische Verteilung der Medikamente verursacht werden (Kodama et al. 2008).

5-FU hat zahlreiche Nebenwirkungen, unter anderem: Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Müdigkeit, Mukositis, Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie, Hautreaktionen und trockene Augen (Lévy et al. 1998, Wettergren et al. 2012).

1.2 Krebsmortalität

Im Jahr 2012 wurden weltweit 14,1 Millionen neu diagnostizierte Krebsfälle und 8,2 Millionen Krebstodesfälle registriert (Ferlay et al. 2015). Dabei stellt das Lungenkarzinom den am häufigsten diagnostizierten Tumor - mit 1,8 Millionen Fällen - weltweit dar, gefolgt vom Mammakarzinom auf Platz zwei (Ferlay et al. 2015).

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist das dritthäufigste diagnostizierte Karzinom bei Männern und das zweithäufigste bei Frauen weltweit mit 1,36 Millionen neu aufgetretenen Fällen im Jahr 2012 (Ferlay et al. 2015). Die globale Inzidenz des KRK variiert um das 10-Fache, wobei 55% der Fälle in entwickelten Regionen auftreten (Ferlay et al. 2015). Die höchsten Inzidenzraten sind in Australien/Neuseeland, Europa und Nordamerika zu finden, die niedrigsten in Afrika und Süd-Zentral-Asien (Jemal et al. 2011). 90% der KRK-Fälle treten nach dem 50. Lebensjahr auf (Abb. 3).

Durchschnittliche Fallzahlen und altersspez. Mortalitätsraten pro 100 000 nach Altersgruppen 2010-2012 (ICD 153, 154) Average number of cases and age-specific mortality rates per 100 000 for agegroups 2010-2012 (ICD 153, 154)												
Alters- gruppe / Agegroup	Westdeutschland / West Germany				Ostdeutschland / East Germany				Deutschland / Germany			
	Männer / Males		Frauen / Females		Männer / Males		Frauen / Females		Männer / Males		Frauen / Females	
	Fallzahl pro Jahr Cases per Year	Alterssp. Age-spec. Mort. Rate	Fallzahl pro Jahr Cases per Year	Alterssp. Age-spec. Mort. Rate	Fallzahl pro Jahr Cases per Year	Alterssp. Age-spec. Mort. Rate	Fallzahl pro Jahr Cases per Year	Alterssp. Age-spec. Mort. Rate	Fallzahl pro Jahr Cases per Year	Alterssp. Age-spec. Mort. Rate	Fallzahl pro Jahr Cases per Year	Alterssp. Age-spec. Mort. Rate
0 - <1	-	0.1	-	0.1	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1
1 - 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 - 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 - 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 - 19	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
20 - 24	3	0.1	4	0.2	1	0.2	-	0.1	4	0.1	4	0.2
25 - 29	7	0.3	5	0.2	-	0.1	1	0.3	7	0.3	6	0.2
30 - 34	19	0.9	15	0.7	3	0.8	1	0.4	23	0.9	16	0.7
35 - 39	37	1.7	31	1.5	5	1.4	5	1.5	42	1.7	35	1.5
40 - 44	76	2.7	75	2.7	16	3.3	11	2.5	91	2.8	86	2.7
45 - 49	222	7.3	164	5.6	50	8.6	24	4.3	272	7.5	188	5.4
50 - 54	375	14.2	268	10.3	86	15.7	51	9.6	461	14.4	319	10.2
55 - 59	620	27.9	376	16.6	171	33.3	87	16.9	791	28.9	463	16.6
60 - 64	939	48.4	517	25.7	223	57.4	108	26.8	1162	49.9	625	25.9
65 - 69	1322	77.8	741	40.7	330	90.9	160	39.5	1652	80.1	901	40.5
70 - 74	2085	112.0	1339	62.7	534	129.4	304	61.1	2619	115.1	1643	62.4
75 - 79	2015	168.6	1464	95.0	517	198.8	364	102.1	2532	174.0	1828	96.3
80 - 84	1826	244.3	1883	158.1	382	259.0	454	170.2	2207	246.7	2336	160.3
85 +	1563	327.0	3300	275.2	281	379.8	632	264.3	1845	334.1	3931	273.4

Abbildung 3: Durchschnittliche Fallzahlen und altersspezifische Mortalitätsraten des kolorektalen Karzinoms (KRK) pro 100 000 nach Altersgruppen 2010-2012 (Becker & Holzmeier 2012)

Bei den krebsbedingten Todesursachen steht das KRK weltweit an vierter Stelle hinter dem Lungenkarzinom, dem Leberkarzinom und dem Magenkarzinom (Ferlay et al. 2015).

In Deutschland stehen maligne Erkrankungen bei beiden Geschlechtern an zweiter Stelle der Todesursachen hinter den Herz-Kreislauferkrankungen (Abb. 4).

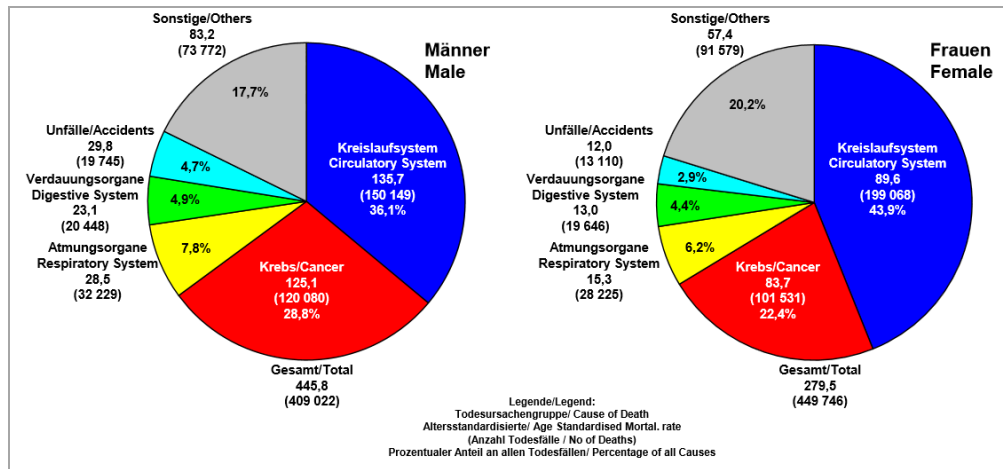


Abbildung 4: Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2012 (Becker & Holzmeier 2012)

Das KRK steht in Deutschland bei den Männern auf Platz zwei der krebisbedingten Todesursachen (hinter dem Lungenkarzinom) und bei den Frauen auf Platz drei (hinter dem Mammakarzinom und dem Lungenkarzinom) (Becker & Wahrendorf 1998).

Die Mortalität des kolorektalen Karzinoms steigt ab dem 50. Lebensjahr exponentiell an (Becker & Wahrendorf 1998). Insgesamt sinkt die Sterblichkeit am KRK seit den 1990-igern, bei beiden Geschlechtern (Becker & Wahrendorf 1998), allerdings besteht in den weniger gut entwickelten Regionen der Welt eine höhere Mortalität (Ferlay et al. 2015). Die absolute Zahl der Krebstodesfälle steigt durch die steigende Lebenserwartung weiter an, es ist aber eine Verlangsamung der Aufwärtsentwicklung zu beobachten (Becker & Wahrendorf 1998). Ob die sinkende Mortalität durch eine sinkende Inzidenz oder durch verbesserte Diagnostik und Therapie bedingt ist, lässt sich nur durch eine vollständige Erfassung aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland klären (Becker & Wahrendorf 1998).

1.3 Kolorektales Karzinom (KRK)

1.3.1 Definition

Als Kolonkarzinom werden Tumore definiert, die bei einer Untersuchung mit einem starren Rektoskop mehr als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt lokalisiert sind (Sobin et al. 2009). Liegen Tumore 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt, so werden sie als Rektumkarzinom definiert (Fielding et al. 1991). Das Rektumkarzinom wird unterteilt in Karzinome des oberen Rektumdrittels (12-16 cm) des mittleren Rektumdrittels (6-<12 cm) und des unteren Drittels (<6 cm) der Anokutanlinie (Sobin et al. 2009).

1.3.2 Pathogenese

Die Mehrheit der KRK entwickelt sich aus intraepithelialen Neoplasien (IEN) innerhalb von Adenomen. Das Tumorprogressionsmodell (Adenom-Karzinom-Sequenz) wurde von Vogelstein und Fearson entwickelt (Vogelstein et al. 1988). Es beschreibt die Tumorentstehung aus normalem Epithel über Adenome bis hin zum Karzinom (Vogelstein et al. 1988). Dieser Vorgang beruht auf einem mehrstufigen Prozess. Durch die Ansammlung von Mutationen wird das Zellwachstum gefördert und es entsteht ein Karzinom (Vogelstein et al. 1988). Dieser Prozess dauert ca. 10 Jahre (Vogelstein et al. 1988). Als eine frühe Veränderung tritt eine Mutation des APC-Tumorsuppressor-Gens auf (Lamlum et al. 1999, Spirio et al. 1998), danach folgen Mutationen des K-RAS-Protoonkogens, ein Verlust der DCC-Expression und im weiteren Verlauf tritt ein Verlust des p53-Tumorsuppressorgens auf (Vogelstein et al. 1988). Ein kleinerer Anteil der Karzinome entsteht aus serratierten Adenomen (Noffsinger 2009). Hier finden sich oft Mutationen des BRAF-Gens und eine Mikrosatelliteninstabilität (Spring et al. 2006).

Patienten, die an einer FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) leiden, haben eine hereditäre APC-Mutation (Lamlum et al. 1999), bei Patienten mit einer HNPCC (Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom; Lynch-Syndrom) findet sich eine Dysfunktion der DNA-Mismatch-Reparatur-Proteine (Chung & Rustgi 1995).

Histopathologisch sind 95% der KRK Adenokarzinome (Stewart et al. 2006).

1.3.3 Risikofaktoren

Neben dem Alter spielt die Lebensweise eine wichtige Rolle für das Risiko zur Entwicklung eines KRK. Hoher Fleischkonsum, vor allem von rotem Fleisch (Larsson & Wolk 2006), hoher Alkoholkonsum (Moskal et al. 2007) sowie körperliche Inaktivität und Übergewicht erhöhen das Risiko für das Auftreten eines KRKs (Giovannucci 2002). Daneben sind hereditäre Erkrankungen, wie die FAP oder das HNPCC, in bis zu 5% der Fälle ursächlich für die Entstehung des KRKs (Jasperson et al. 2010). Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines KRKs bei einem Betroffenen besteht bei Risikoerkrankungen, wie kolorektale Adenome (Vogelstein et al. 1988) und langfristig bestehende chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Collins et al. 2006), aber auch bei einem KRK bei erst- oder zweitgradigen Verwandten (Johns & Houlston 2001).

1.3.4 Vorsorge

Die Vorsorgeuntersuchungen für das KRK werden in Deutschland bei der asymptomatischen Bevölkerung ab dem 50. Lebensjahr empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

10 Jahre vor dem Lebensalter, in dem bei dem Indexpatienten das KRK aufgetreten ist, sollte bei Verwandten ersten Grades mit der Vorsorgekoloskopie begonnen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Bei Risikopatienten aus Familien mit hereditärem Kolonkarzinom (FAP, HNPCC) wird ein früher Beginn der Vorsorge empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Auch Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen profitieren von regelmäßigen Kontrollkoloskopien, da Tumore in früheren Stadien entdeckt und behandelt werden können (Collins et al. 2006). Im Rahmen der körperlichen Untersuchung sollte eine digital-rektale Untersuchung durchgeführt, da nahezu 10% der rektalen Tumore palpabel sind (Herold 2015). Die komplette Koloskopie hat die höchste Sensitivität und Spezifität zur Diagnostik des KRK und stellt somit das Standardverfahren in der Früherkennung dar (Kahi et al. 2009, Pox et al. 2012). Bei unauffälligem Befund sollte die Koloskopie in 10 Jahren wiederholt werden. Werden Polypen gefunden und abgetragen, so gilt die klinische Empfehlung, die Koloskopie je nach Anzahl der gefundenen Polypen nach drei bis fünf Jahren zu wiederholen (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

1.3.5 Klinik

Die häufigsten Symptome des KRK sind Stuhlunregelmäßigkeiten, wie Verstopfungen und Diarrhoe, rektale Blutungen und abdominale Beschwerden (Kyle et al. 1991, Macrae & St John, D J 1982) sowie Hämatochezie und Melena. Bei der Mehrheit der Patienten können eine chronische Eisenmangelanämie und okkulte Blutungen beobachtet werden (Majumdar et al. 1999). Patienten mit einem KRK können an unspezifischen Beschwerden wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Leistungsminderung, Fieber und ungewolltem Gewichtsverlust leiden. Eine Studie des Kaiser Permanente Centers zeigte, dass bei einem Drittel der Patienten das KRK zufällig im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen entdeckt wurde (Moiel & Thompson 2011). Diese Tumore sind oft in niedrigeren Stadien, als die Tumore der Patienten mit Symptomen (Speights et al. 1991).

1.3.6 Diagnostik und Staging

In der präoperativen Ausbreitungsdiagnostik sollte im Rahmen einer ausführlichen körperlichen Untersuchung eine digital-rektale Untersuchung erfolgen (Isbert & Germer 2012). Der Goldstandard zur Diagnostik des KRK ist die Koloskopie. Mit dieser Untersuchung können multiple Tumore im gesamten Darm gefunden und durch die Entnahme einer Biopsie histologisch untersucht werden (Barillari et al. 1990, Faivre 1997). Trotzdem werden in der Koloskopie ca. 30% der multiplen Tumore nicht gefunden (Chen & Sheen-Chen 2000). Sollte keine vollständige Koloskopie möglich sein, z.B. aufgrund einer Stenose, so wird eine präoperative CT- oder MR-Kolonografie empfohlen (Neri et al. 2002). Zum präoperativen Staging des KRK gehören die Abdomensonographie sowie die Röntgenthoraxaufnahme in zwei Ebenen (Abb. 3) (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Bei auffälligen Befunden, Verdacht auf Fernmetastasen oder Infiltration von Nachbarorganen sollten ein CT-Abdomen und -Becken (Horton et al. 2000) bzw. ein CT-Thorax durchgeführt werden (Kirke et al. 2007) (Abb.3). Zur lokalen Ausbreitungsuntersuchung beim Rektumkarzinom sollten zusätzlich eine starre Rektoskopie, eine transrektale Sonographie (Isbert & Germer 2012) und bei unklarem Sonographie-Befund eventuell ein Spiral-CT des Abdomens durchgeführt werden (Abb. 5) (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

Untersuchung	KolonCa	RektumCa
Komplette Koloskopie	X	X
CEA	X	X
Abdomensonographie	X	X
Rö-Thorax	X	X
Starre Rektoskopie		X
MR-(CT)- Becken mit Angabe Abstand des Tumors zur mesorektalen Faszie		X
Rektale Endosonographie bei lokal begrenztem Tumor		X

Abbildung 5: Staging beim KRK (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014)

Der Tumormarker CEA (carcinoma-embryonal Antigen) sollte aufgrund seiner geringen Sensitivität nicht zum Tumorscreening eingesetzt werden (Palmqvist et al. 2003). CEA hat aber eine Bedeutung für die Nachsorge, da präoperativ erhöhte Werte bei vollständiger Resektion fallen und bei einem Rezidiv erneut ansteigen (Locker et al. 2006).

Die Klassifikation des Kolonkarzinoms erfolgt nach der allgemein für Tumore verwendeten TNM-Klassifikation (T=Tumorausdehnung, N=Lymphknotenbefall, M=Fernmetastasierung) (Abb. 6) (Sobin et al. 2009). Die Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms erfolgt nach den Kriterien der UICC 2010 (Union for International Cancer Control) (Abb. 7) (Sobin et al. 2009).

Zum Diagnosezeitpunkt haben ca. 20% der Patienten Metastasen (Mekenkamp, L J M et al. 2010). Die Metastasierung kann lymphogen, hämatogen und per continuitatem erfolgen. Das Kolonkarzinom metastasiert lymphogen in die mesenterialen Lymphknoten und hämatogen über die Vena portae, dem venösen Abfluss, in die Leber (Herold 2015). Beim Rektumkarzinom hängt der Metastasierungsweg von der Lokalisation des Tumors ab. Die Tumore metastasieren lymphogen in die regionalen Lymphknoten. Hämatogen erfolgt eine Metastasierung der Karzinome des oberen Rektumdrittels (12-16 cm) ebenfalls über die Vena portae in die Leber, des mittleren Rektumdrittels (6-12 cm) sowohl in die Leber, als auch über die Vena cava in die Lunge und der Tumore des unteren Rektumdrittels (< 6cm) in die Lunge (Herold 2015).

Hämatogene Metastasen in anderen Organen, wie das Skelett und in das Gehirn, sind möglich.

TNM Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms	
Tis	Carcinoma in situ: Intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
T1	Submukosa
T2	Muskularis propria
T3	Subserosa, nicht peritonealisiertes perikolisches/perirektales Gewebe
T4a	Viszerales Peritoneum
T4b	Andere Organe und Strukturen
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen (LK) [mind. 12 LK untersuchen um den Lymphknotenstatus sicher zu bestimmen]
N1a	1 LK
N1b	2-3 LK
N1c	Tumorknötchen [=Satellit(en)] im Fettgewebe der Subserosa oder perikolischen/-rektalen Fettgewebe ohne regionäre LK
N2a	4-6 LK
N2b	≥ 7 LK
M0	Keine Fernmetastasen (M)
M1a	Fernmetastasen in 1 Organ
M1b	Fernmetastasen in mehr als 1 Organ oder im Peritoneum

Abbildung 6: TNM Klassifikation des KRK (UICC, 2010) (Herold 2015)

UICC 2010	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium 1	T1/T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium IIIA	T1/T2	N1	M0
Stadium IIIB	T1	N2a	M0
	T3/T4a	N1	M0
Stadium IIIC	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	M0
	T4b	N1/N2	M0
Stadium IV4a	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IV4b	Jedes T	Jedes N	M1b

Abbildung 7: UICC-Klassifikation des KRK in Anlehnung an (Herold 2015)

1.3.7 Therapie

Die Behandlungsmöglichkeiten des KRK sind vom Erkrankungsstadium sowie dem Allgemeinzustand des Patienten abhängig (Stintzing 2014). Die Planung der Behandlung des KRK sollte durch eine interdisziplinäre Tumorkonferenz erfolgen (Wright et al. 2009).

1.3.7.1 Chirurgische Therapie

Das Ziel der kurativen chirurgischen Therapie ist eine vollständige Resektion des Tumors (R0). Bei 70-80% der Patienten mit einem neu diagnostizierten KRK kann eine kurative chirurgische Therapie erfolgen (Lombardi et al. 2010). Die kurative chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms beinhaltet eine en-block Resektion des tumortragenden Kolonabschnittes in Form einer radikalen Hemikolektomie, Transversum- oder Sigmaresektion mit Entfernung des Mesenteriums und des drainierenden Lymphgebietes (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014, Stintzing 2014). Bei low-risk Tumoren (pT1, G1/G2, L0, R0) wird über die Durchführung einer endoskopischen Mukosaresektion diskutiert (Stintzing 2014). Das Ziel der kurativen chirurgischen Therapie des Rektumkarzinoms ist eine kontinenserhaltende Tumoresektion (R0). Kleine (uT1, N0, M0) und gut differenzierte Tumore (G1/G2) können auch hier durch lokale Tumorexzision therapiert werden (Sengupta & Tjandra 2001, Stintzing 2014). Bei Tumoren in höheren T-Stadien sollte zusätzlich zur Rektumresektion eine Resektion des Mesorektums mit dem drainierenden Lymphgebiet erfolgen (totale Mesorektumexzision, TME) (Stintzing 2014). Die Tumore müssen mit einem ausreichendem Sicherheitsabstand reseziert werden (Kwok et al. 1996, Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Ist bei Tumoren mit Sphinkterinfiltration keine kontinenserhaltende Operation möglich, so sollte eine abdomino-perineale Resektion erfolgen (Nagtegaal et al. 2005). Diese ist mit einer höheren Rate an Komplikationen assoziiert (West et al. 2010).

Intraoperativ wird die Inspektion der Leber auf Metastasen empfohlen. Isolierte Leber- und Lungenmetastasen sollten reseziert werden (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

Die palliative chirurgische Therapie dient in erster Linie dem Passage-Erhalt (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

1.3.7.2 Systemische Therapie

Die molekulare Zusammensetzung des Tumors spielt zunehmend eine Rolle in der Therapie des KRKs (Stintzing 2014). Die histologische Analyse der Tumore auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und die Testung der Mutationsanalyse auf KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) und BRAF (proto-oncogene B-Raf) sowie die Interpretation der therapeutisch wichtigen Ergebnisse erfolgt durch die Pathologen (Fleming et al. 2012). Das KRK wird gewöhnlich mit einer adjuvanten Chemotherapie (nach der Operation) behandelt. Das Ziel der adjuvanten Therapie ist die Zerstörung von Mikrometastasen und die Reduktion der Häufigkeit von Rezidiven (Lombardi et al. 2010). Bei Patienten mit KRK im Stadium UICC III konnte durch eine adjuvante Chemotherapie eine statistisch signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens beobachtet werden (Labianca et al. 1995, Carrato 2008, O'Connell et al. 2004). Im Stadium UICC I des KRK und bei low-risk Tumoren ist nach der chirurgischen Resektion keine adjuvante Therapie mehr erforderlich (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014, Stintzing 2014). Bei Patienten mit Tumoren im Stadium II ist der Nutzen der adjuvanten Chemotherapie nicht so deutlich, wie bei Patienten im Stadium UICC III (Wolpin & Mayer 2008), sodass es keine Empfehlung für eine routinemäßige adjuvante Chemotherapie bei Patienten mit KRK im Stadium UICC II gibt (Benson et al. 2004). Es sollte individuell in Abstimmung mit dem Patienten und unter Berücksichtigung der Prognose und von eventuell vorhandenen prognostischen Hochrisikomerkmale des Tumors wie z.B. des Tumorgrades, der vaskulären Invasion oder anhand der Invasionstiefe in das perirektale Fettgewebe bei Rektumkarzinomen entschieden werden, ob der Patient von einer adjuvanten Chemotherapie profitiert (Benson et al. 2004, Lombardi et al. 2010, Willett et al. 1999).

Das am meisten verwendete Medikament ist das Zytostatikum 5-FU, welches regelmäßig in der post-operativen Therapie des KRK im Stadium UICC III eingesetzt wird (Carrato 2008).

Bei einer Monotherapie des KRKs mit 5-FU liegen die Ansprechraten zwischen 10-20% und das mediane Überleben beträgt weniger als 12 Monate (Johnston & Kaye 2001).

Die Kombination von LV (Folinsäure) und 5-FU verbessert die Wirkung im Vergleich zur 5-FU Monotherapie (Wolpin & Mayer 2008, Zhang et al. 1992). Es wird die Gabe von 5-FU als kontinuierliche Infusion der Bolusgabe vorgezogen, da die Patienten mit einer Dauerinfusion weniger toxische Nebenwirkungen haben (Barone 2008).

Orale Fluoropyrimidine, wie Capecitabine, stellen eine Alternative zu intravenösem 5-FU dar (Johnston & Kaye 2001). Die Ansprechrate des KRK verbessert sich auf 40-50% durch die zusätzliche Gabe von Oxaliplatin (einem Platinderivat) sowie Irinotecan (einem Topoisomerase I Inhibitor) zu 5-FU und LV (Douillard et al. 2000, Giacchetti et al. 2000, Tournigand et al. 2006, Tournigand et al. 2004).

Standardregime der adjuvanten Chemotherapie sind FOLFOX (5-Fluorouracil, LV, Oxaliplatin), (André et al. 2004) und XELOX (Capecitabine, Oxaliplatin) (Haller et al. 2011).

Die Therapie des Rektumkarzinoms unterscheidet sich von der des Kolonkarzinoms in der perioperativen Behandlung (Stintzing 2014). Bei Rektumkarzinomen im Stadium UICC II und III ist eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie (vor der Operation) und gegebenenfalls auch eine adjuvante Chemotherapie empfohlen (Sauer et al. 2004, Stintzing 2014). Für die neoadjuvante Radio-Chemotherapie wird eine 5-FU haltige Chemotherapie empfohlen (Hofheinz et al. 2012, Nussbaum & Altomare 2015), die zusammen mit einer fraktionierten Radiotherapie (Gesamtdosis von 50.4 Gy) über einen Zeitraum von fünf Wochen verabreicht wird (Sauer et al. 2004). Die neoadjuvante Radio-Chemotherapie verbessert im Vergleich zur adjuvanten Therapie die lokale Tumorkontrolle und ist weniger zytotoxisch (Sauer et al. 2004). Sie verlängert aber nicht das Gesamtüberleben (Sauer et al. 2004). Durch eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie des Rektumkarzinoms ist ein Down-Staging möglich, sodass bei einer Reevaluation nach 4-6 Wochen eventuell eine kontinenzerhaltende Operation mit geringerem Sicherheitsabstand (Rutkowski et al. 2008) durchgeführt werden kann (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

Die Therapie des metastasierten Kolon- und Rektumkarzinoms (mKRK, UICC Stadium IV) ist identisch (Stintzing 2014).

Eine Chemotherapie beim metastasierten, nichtresektablen KRK ist meist palliativ mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der Lebensqualität und einer Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens der Patienten (Weeks et al. 2012). Bei einigen Patienten mit Lebermetastasen ist aber dennoch, mithilfe der systemischen Chemotherapie, eine Kuration möglich (Alberts 2012, Nordlinger et al. 2009).

Patienten mit mKRK, die eine systemische Chemotherapie mit 5-FU erhalten, haben ein signifikant längeres Gesamtüberleben (11,0 Monate) als Patienten mit mKRK, die

nur Best Supportive Care (BSC) erhalten (5,0 Monate), bei vergleichbarer Lebensqualität in beiden Gruppen (Scheithauer et al. 1993).

Durch die zusätzliche Gabe von Oxaliplatin und Irinotecan kann das Überleben weiter verlängert werden. Sowohl FOLFOX (Tournigand et al. 2006) als auch die Therapie mit FOLFIRI (5-FU, LV, Irinotecan) sind beim mKRC ein Standard first-line Regime die beide das mediane Gesamtüberleben der Patienten auf 20 Monate verlängern (Tournigand et al. 2004). Durch die Therapie mit FOLFOXIRI (5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin) konnte bei sorgfältig ausgewählten, jüngeren und medizinisch fitteren Patienten eine bessere Wirksamkeit gezeigt werden, als durch die Therapie mit FOLFIRI (Falcone et al. 2013, Stintzing 2014). Da FOLFOXIRI allerdings eine höhere Zytotoxizität aufweist, sollte es nur bei ausgewählten Patienten angewendet werden (Stintzing 2014).

Eine weitere Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens ist durch die Gabe von monoklonalen Antikörpern, wie den EGFR-Antikörpern Cetuximab (van Cutsem et al. 2011) und Panitumumab (Douillard et al. 2014), zusätzlich zur Chemotherapie zu erzielen.

Die zusätzliche Gabe des VEGF-Antikörpers Bevacizumab zur Chemotherapie verbessert das progressionsfreie Überleben, aber verlängert nicht das Gesamtüberleben (Saltz et al. 2008).

Eine Therapie mit den EGFR-Antikörpern ist nur bei Patienten mit KRAS Wild-typ-Tumoren effektiv (Douillard et al. 2014, van Cutsem et al. 2011). Daher ist es wichtig vor Beginn der Therapie mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab, Panitumumab oder Bevacizumab das Ergebnis der KRAS- Mutationsanalyse des Tumors zu kennen (Stintzing 2014, Wang et al. 2010). Bei Tumoren mit KRAS-Mutationen kann Bevacizumab mit den gängigen first-line-Chemotherapie Regimen (FOLFOX, FOLFIRI oder FOLFOXIRI) kombiniert werden (Fuchs et al. 2008, Loupakis et al. 2014, Saltz et al. 2008).

1.3.8 Prognose und Nachsorge

Die 5-Jahresüberlebensraten sind abhängig vom Stadium der Erkrankung. Sie betragen im Stadium I bis zu 86% und sinken bis auf 10% im Stadium UICC IVb ab (Lan et al. 2012). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei Patienten mit KRC bei 54% in Deutschland und bei 60% in Nordamerika (Coleman et al. 2008).

Patienten mit einem KRK des UICC-Stadiums II und III (nach R0-Resektion) werden regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen empfohlen (zum Nachsorgeschema siehe Abb. 8).

Untersuchung	Monate										
	3	6	9	12	15	18	21	24	36	48	60
Anamnese, körperliche Untersuchung, CEA		X		X		X		X	X	X	X
Koloskopie		X*		X**							X**
Abdomensonographie		X		X		X		X	X	X	X
Sigmoidoskopie (Rektoskopie)***		X		X		X		X			
Spiral CT [bei Rektum CA]	X										
Röntgen Thorax [bei Rektum CA]				X				X	X	X	X
*wenn keine vollständige Koloskopie präoperativ erfolgt ist											
**bei unauffälligem Befund nächste Koloskopie nach 5 Jahren											
***nur beim Rektumkarzinom ohne neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie											

Abbildung 8: Nachsorgeschema bei KRK im Stadium UICC II oder III (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014)

2 Fragestellung

Trotz der Fortschritte in der adjuvanten Chemotherapie und in den chirurgischen Techniken gab es nur eine geringe Verbesserung des Überlebens der Patienten (Bourret et al. 1979, Krook et al. 1991). Die 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit KRK liegt immer noch nur bei 44% in Großbritannien und bei 60% in Nordamerika (Coleman et al. 2008). 5-Fluorouracil (5-FU; 1) wird regelmäßig in der post-operativen Therapie des KRK im Stadium UICC III eingesetzt (Carrato 2008), aber auch zur Therapie zahlreicher weiterer solider Tumore verwendet (Bodner-Adler et al. 2007, Kish et al. 1994, Zhao et al. 2013).

Die Wirkung von 5-FU (1) beruht auf der Hemmung der Thymidylat Synthase (Sommer & Santi 1974) sowie der Integration der Metabolite in die RNA und DNA der Zellen (Ishii & Marumo 2004, Pettersen et al. 2011). Darüber hinaus wird angenommen, dass der Mechanismus und der Umfang des Zellschadens an humanen Zellen durch Chemotherapeutika, wie z.B. 5-FU, auch vom Signalweg des programmierten Zelltodes (Apoptose) abhängt (Lowe et al. 1993).

Trotz adäquater Therapie bekommen 30-50% der Patienten mit KRK im Verlauf ein Rezidiv oder versterben an ihrer Erkrankung (Adam Naguib et al. 2012).

Die bedeutendsten klinischen Probleme der Therapie sind Resistenzen des Tumors gegen die Chemotherapie, Nebenwirkungen der angewendeten Chemotherapeutika und Metastasierung des Tumors trotz adäquater Therapie.

Mehrere Patienten, die mit 5-FU (1) behandelt werden, haben Tumore, die eigentlich resistent gegen 5-FU sind (Nita et al. 1998). Resistenzen können über viele Mechanismen entstehen, beispielsweise durch eine Mutation im p53 Tumorsuppressorgen (Nita et al. 1998) oder durch eine vermehrte Expression der Thymidylat Synthase (Copur et al. 1995, Johnston et al. 1992).

Die Nebenwirkungen eines Medikaments können durch hohe Blutkonzentrationen und eine unspezifische systemische Verteilung der Medikamente entstehen (Kodama et al. 2008, Mader et al. 2011), z.B. wenn durch eine stark eingeschränkte Verfügbarkeit nur ein kleiner Prozentteil der eingesetzten Dosis des Medikamentes das Tumorgebiet erreicht (Mader et al. 2011).

Um bessere Therapieerfolge zu erzielen, wurden verschiedene Applikationsverfahren des Medikaments getestet, z.B. die Bolusgabe von 5-FU, die Gabe als Dauerinfusion über einen längeren Zeitraum hinweg (Barone 2008) oder die topische Anwendung bei der aktinischen Keratose und dem Basalzellkarzinom (Albert 1985, Heidelberger et al.

1958). Eine andere Möglichkeit um die Effektivität der Therapie zu verbessern, ist die Veränderung der molekularen Struktur des Medikaments, um die Diffusionsrate und die Verfügbarkeit im Tumorgebiet zu erhöhen.

Die intrathekale Behandlung mit 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine (2b) von malignen Hirntumoren mit meningealer Dissemination zeigte, dass dieses Nukleosid eine ausgezeichnete Antitumoraktivität und eine minimale Neurotoxizität aufweist (Yamada et al. 1998). Eine hohe Hydrophilie stellt in diesem Zusammenhang einen der größten Nachteile von vielen Medikamenten dar, da diese die Penetration durch die Zellmembran, aber auch die Passage der Blut-Hirn-Schranke verhindert. Um diese Probleme zu beheben – die relative Hydrophobie zu erhöhen und pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern – ist das Einfügen von lipophilen Resten in die Struktur des Medikaments wünschenswert (Peters 1995). Um ein möglichst niedriges molekulares Gewicht der Medikamente zu erhalten, ist es wichtig, dass die chemischen Veränderungen „Lipinskis Regel der Fünf“ entsprechen (Ghose et al. 1999, Lipinski et al. 2001). Diese Regel beschreibt die molekularen Eigenschaften, die wichtig sind für die Pharmakokinetik eines Medikamentes im menschlichen Körper und schließt die Absorption, die Distribution, den Metabolismus und die Exkretion mit ein (ADME). Sie ist essentiell für die Herstellung von Medikamenten, um eine pharmakologisch aktive Substanz schrittweise zu optimieren und um die Aktivität und Selektivität zu verbessern. Vor diesem Hintergrund stellten Prof. Dr. Rosemeyer und Frau Dr. Malecki im Rahmen eines Kooperationsprojekts (Prof. Rosemeyer, Osnabrück/Prof. Kinscherf, Marburg) verschiedene Derivate von 5-Fluorouridine (5-FUrd; 2a) her, welche lipophile Reste in N(3)- und/oder in 2'3'-O-Position tragen (3a-7a, 3c, 2c, 3b-7b), mit dem Ziel einer verbesserten Wirksamkeit und einer geringeren Rate an Nebenwirkungen (Köstler et al 2013, Malecki et al. 2013a, Malecki et al. 2013b, Malecki et al. 2014, Malecki & Rosemeyer 2010, Rosemeyer et al. 2012, Rosemeyer & Malecki 2012, Werz et al. 2013. Zusätzlich wurde zum Vergleich das 2'3'-O-Nonadecylidene Derivat von Uridin, 3c, hergestellt (Köstler et al. 2013).

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die zellgestützte Testung des Drug Delivery Konzeptes der „Lipid-Nucleosid- und Polysaccharid-Konjugate von 5-Fluorouracil“ (2a, 3a-7a, 3c, 2c, 3b-7b). Die Fragestellungen waren deshalb, ob die fluoreszenzmarkierten Substanzen von unterschiedlichen Zelltypen (vorwiegend Krebszelllinien) internalisiert werden (2c, 3b-7b), welchen Einfluss die Aufnahme der Testsubstanzen auf die Proliferation und Apoptose der Zellen hat (zur Testung der

zytostatischen/zytotoxischen Aktivität) und wie sich die Behandlung der Zellen mit diesen Substanzen auf die Gensignatur (zur Testung der Signaltransduktion) auswirkt? Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wird intensiv für wissenschaftliche Untersuchungen genutzt und ist gut bekannt (Bonaterra et al. 2013, Tang et al. 2007). Um die Effekte der Substanzen auch an anderen Krebszelllinien zu testen verwendeten wir zwei weitere Zelllinien: eines humanen hepatozellulären Karzinoms (HepG2) (Redman et al. 1983, Zeng et al. 2014) und eines murinen Nierenzellkarzinoms (RENCA) (Ishii & Marumo 2004, Salup et al. 1985) sowie differenzierte Makrophagen (THP-1) als Beispiel für sich nicht mehr teilende differenzierte Zellen (Busca et al. 2014).

3 Material

3.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
5-Fluoracil	Sigma- Aldrich, Saint Louis, USA
5-Fluorouridinderivate 3a-7a,3c, 3b-7b	Prof. Dr. Helmut Rosemeyer, Institut für Chemie, Universität Osnabrück, Germany
10x Reaktionspuffer (DNase Verdau)	Fisher Scientific, Schwerte, Germany
ATTO 425 [®]	ATTO-TEC, Siegen, Germany
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Deoxynucleotide Mix (dNTP)	Agilent Technologies Life Sciences and Chemical Analysis, Waldbronn, Germany
Deoxyribonuclease I (DNase I), RNase-free	Fermentas, Thermo Fisher Scientific - Germany GmbH, Schwerte , Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	HYBRI MAX [®] , Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Agilent Technologies Life Sciences and Chemical Analysis, Waldbronn, Germany
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Thermo Scientific, Schwerte, Germany
Fötale Kälberserum (FKS)	Standard Quality EU aproved, PAA Laboratories, Pasching, Austria
Hoechst 33342	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
Isopropanol 100%	Roth, Karlsruhe, Germany
Oligo (dT) ₁₈ primer	Fermentas, Thermo Fisher Scientific - Germany GmbH, Schwerte , Germany
Phosphatgepufferte Salzlösung Without Ca& Mg, steril (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching Austria
peqGOLD TriFast [™]	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany
Phorbol myristate acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

PrestoBlue™ reagent	Invitrogen-Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
Pro Long® Gold antifade reagent	Invitrogen-Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, Thermo Fisher Scientific - Germany GmbH, Schwerte, Germany
RNase AWAY® (Dekontaminationslösung)	Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA
RNase ZAP® RNase (Zap(Dekontaminationslösung))	Ambion, Life Technologies, GmbH, Darmstadt, Germany
RPMI 1640 Zellkulturmedium	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Tris-EDTA Puffer (TE)ph8,0	Ambion Life Technologies, GmbH, Darmstadt, Germany
Trypanblau, in 0,4% Lösung in Aqua dest., sterilfiltriert	Merck, Darmstadt, Germany
Trypsin/EDTA (1x) Lösung, 0,05%/0,02% in Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (D-PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Austria
UltraPURE™ DNase/RNase free Destilled Water	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
YO-PRO®-1 Iodide	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien

Verwendete Kits

Kit	Inhalt	Hersteller
Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase	AffinityScript Reverse Transcriptase (RT) AffinityScript RTPuffer 10x 100 mM DTT	Agilent, Technologies Life Sciences and Chemical Analysis, Waldbronn, Germany
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent RNA 6000 Nano Chips Ladder DyeKonzentrat Marker Gel Matrix	
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix	Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix Reference dye, ROX (1mm) 2x	

Tabelle 2: Liste der verwendeten Kits

Primer

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Qiagen GmbH, Hilden; Deutschland.

Primer	Symbol	Amplikonlänge (bp)	Katalognummer
Actin, beta	Actb	146 bp	QT00095431
Beta-2-Mikrogloblin	B2M	98 bp	QT00088935
BCL2-associated X protein	Bax	111 bp	QT00031192
Caspase 3	Casp3	147 bp	QT00023947
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	119 bp	QT01192646
Interleukin 8	IL-8	102 bp	QT00000322
Tumorsuppressor p53	Tp53	112 bp	QT00060235
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	105 bp	QT00024633

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer

3.2 Zelllinien

Zelllinie	Firma
HT-29-Zelllinie (humanes Kolonkarzinom)	DSMZ, GmbH, Braunschweig, Germany
THP-1-Zelllinie (humane akute Monozyten Leukämie)	DSMZ, GmbH, Braunschweig, Germany
HepG2-Zelllinie (humanes hepatozelluläres Karzinom)	DSMZ, GmbH, Braunschweig, Germany
RENCA-Zelllinie (Maus Nierenzellkarzinom)	CLS, Eppelheim, Germany

Tabelle 4: Liste der verwendeten Zelllinien

3.3 Einmalmaterial

Material	Hersteller
6-Well Platten	BD Falcon™ Multiwell, Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Germany
8-well culture slide	flexiPERM®, Sarstedt AG, Sevelen, Switzerland
96-Well Platten	BD Falcon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
Agilent RNA Nano Chips	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Germany
Biosphere FilterTips, steril, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sardtedt AG, Nümbrecht, Germany
C-Chip (DHC-N01)	Digital Bio,NanoEn Tek Inc., Seoul, Korea
DNAse freie Cups 2 ml 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Eppendorf Combitips Biopur® 1,25 ml; 12,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg Germany
Flaconröhrchen steril,15 ml; 50 ml	Sardtedt AG, Nümbrecht, Germany
QPCR 96-Well Platten	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Serologische Pipetten steril, pyrogenfrei 5 ml, 10 ml, 25ml, 50 ml	Sardtedt AG, Nümbrecht, Germany
Tissue Culture Flask T-25; T-75	Sardtedt AG, Nümbrecht, Germany
Zellschaber, Cell Scarper M	TRP, Switzerland 99003
Optical tube strips (8x Strip) Verschlussstreifen für 96-Well Platte	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

Tabelle 5: Liste der verwendeten Einmalmaterialien

3.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Axio Image.M2 Mikroskop	Carl Zeiss GmbH, Jena Germany
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Biofuge fresco Heraeus	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany
Brutschrank B 5042	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany
Chip priming station	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Thermozykler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik GmbH, Mülheim, Germany
MJ- Research PTC- 200 Thermocycler	Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, USA
Multipette 4780	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
NANO DROP 2000c Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany
Sicherheitswerkbank-HeraSafe	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany
SUNRISE ELISA-reader	Tecan, Salzburg, Austria
Real- time Thermozykler Mx3005P QPCR Systems	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Vortexer MS 3	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany
Zentrifuge Perfect Spin P	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany
Zentrifuge Pico 17	Heraeus Holding GmbH, Hanau. Germany

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte

3.5 Programme und Software

Software	Firma	Anwendung
AxioCam HRc/ Axio Vision Rel 4.8	Carl Zeiss GmbH, Jena Germany	Bildbearbeitungssystem
NormFinder.xla	Molecular Diagnostics Laboratories, Covington, USA	Housekeeping Gene
ZEN 2011. AxioVision SE64 Rel. 4.8.3	Carl Zeiss GmbH, Jena Germany	Lichtmikroskopische Auswertungen
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	Real Time PCR
Sigma Plot 12.0	Systat Software, Inc, Chicago, USA	Statistische Auswertung

Tabelle 7: Liste der verwendeten Programme und Software

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für die Experimente verwendet:

HT-29-Zelllinie

HT-29 (humane Kolonkarzinom) Zelllinie: HT-29-Zellen sind adhärent wachsende Zellen. Die Zelllinie wurde 1964 aus einem Adenokarzinom des Kolons einer 44 Jahre alten Frau isoliert und in Kultur genommen.

THP-1-Zelllinie

THP-1 (humane akute Monozyten Leukämie) Zelllinie: Diese Zelllinie entstammt aus dem peripheren Blut eines an akuter Leukämie (AML) erkrankten einjährigen Jungen.

HepG2-Zelllinie

HepG2 (humane hepatozelluläre Karzinom) Zelllinie: HepG2 Zellen sind adhärent wachsende Zellen. Die Zellen wurden aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Jungen entnommen und kultiviert.

RENCA-Zelllinie

RENCA (Maus Nierenzellkarzinom) Zelllinie: Diese Zellen wurden aus einem spontan entstandenem Adenokarzinom einer Mausniere entnommen.

4.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in 90% RPMI 1640 ergänzt mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS), (30 min. hitzeinaktiviert bei 56°C) kultiviert. Dieses wurde mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 48 h. Das Arbeiten erfolgte unter einer sterilen Sicherheitswerkbank mit Schutzhandschuhen, um mögliche Kontaminationen der Zellen zu vermeiden.

4.1.2.1 Kryokonservierung der Zellen

Um die Zellen dauerhaft aufzubewahren, wurden sie in flüssigen Stickstoff eingefroren. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gespült. 1 ml Trypsin/EDTA- Lösung wurde dem Zellrasen zugesetzt. Die Zellen inkubierten nun ca. 10 min im Brutschrank, bis das Trypsin die Zellen von dem Boden der Nährflasche abgelöst hat. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 250 x g abzentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 1 ml Nährmedium mit 10% FKS aufgenommen und in ein steriles Cup überführt. Die Zellen wurden für 2-3 h bei -20°C in den Kühlschrank zum vorkühlen gestellt. Anschließend wurde gekühltes Einfriermedium im Verhältnis 1:1 zu den Zellen gegeben. Das Einfriermedium besteht aus RPMI mit 10% FKS und 20% DMSO. Unmittelbar nach Zufügen des Einfriermediums wurden die Zellen für 24 h bei -80°C eingefroren. Danach wurden sie im Flüssigstickstofftank aufbewahrt.

4.1.2.2 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstoffbehälter genommen und 2 min im Wasserbad bei 37°Celsius aufgetaut. Anschließend wurden sie mit 10 ml frischem Medium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 250 x g zentrifugiert, um das DMSO auszuwaschen. Die Zellen wurden in eine Kulturflasche gegeben. Nach 24 h Kultivierung bei 37°C im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen.

4.1.2.3 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gespült. 1ml Trypsin/EDTA- Lösung wurde dem Zellrasen zugesetzt. Die Zellen wurden 10 min bei 37°C inkubiert, bis das Trypsin die Zellen von dem Boden der abgelöst hat. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Um ein kontinuierliches Zellwachstum gewährleisten zu können, wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen 1:10 gesplittet. Die Viabilität und die Zellzahl wurden mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die lebenden Zellen wurden in der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Zellzahl der vier großen Kammern}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

4.2 Verwendete Substanzen

Die von uns verwendeten Substanzen wurden im Chemischen Institut der Universität Osnabrück von Herrn Professor Rosemeyer und Frau Dr. Malecki synthetisiert (Malecki 2013).

Hergestellt wurde eine Reihe von Nucleolipidderivaten von 5-FUrd (2a), die lipophile Gruppen an N(3)- und/oder in 2'3'-O-Position (3a-7a und 3c) tragen (Köstler et al 2013, Malecki et al. 2013b, Malecki et al. 2014, Malecki & Rosemeyer 2010, Rosemeyer et al. 2012, Rosemeyer & Malecki 2012, Werz et al. 2013).

Die meisten dieser Derivate wurden mit dem Cumarin-fluoreszierenden Farbstoff ATTO 425[®]-konjugiert, um eine mögliche Internalisierung durch Zellen dokumentieren zu können. Das ATTO 425[®] wurde als N(9)-Butanone am 5'-OH des Nucleolipids gebunden (3b-7b) (Malecki et al. 2013a). Die Herstellung der Derivate 3b-7b wurde beschrieben in Malecki et al. 2013a.

Die Derivate 4a und 6a wurden hergestellt wie von Malecki & Rosemeyer 2010 beschrieben. Die Herstellung des Derivates 3a wurde beschrieben in Rosemeyer & Malecki 2012. Das Derivat 5a wurde hergestellt wie in Malecki et al. 2013b. Das Derivat 3c wurde hergestellt wie beschrieben wurde in Rosemeyer et al. 2012, Werz et al. 2013. Das Derivat 7a wurde aus einem nicht-farnesylierten Vorläufermolekül hergestellt (Köstler et al 2013, Malecki et al. 2013b, Malecki et al. 2014, Malecki & Rosemeyer 2010, Rosemeyer & Malecki 2012) Die Substanzen wurden aus „Stock-Lösungen“ bzw. Lyophilisaten in DMSO gelöst, um Konzentrationen von 10 µM, 20 µM, 40 µM und 80 µM zu generieren (Da Violante et al. 2002, Miret et al.2006).

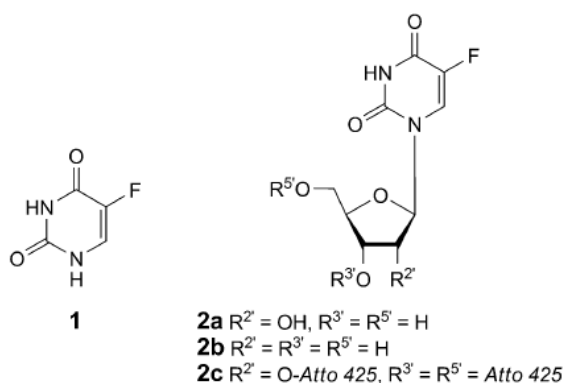


Abbildung 9: Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU; 1) und dessen Derivate 5-Fluorouridine (5-FUrd; 2a) und 2'-Deoxy-5-Fluorouridine (Floxuridine, 5-FdUrd; 2b) (Malecki et al. 2013a)

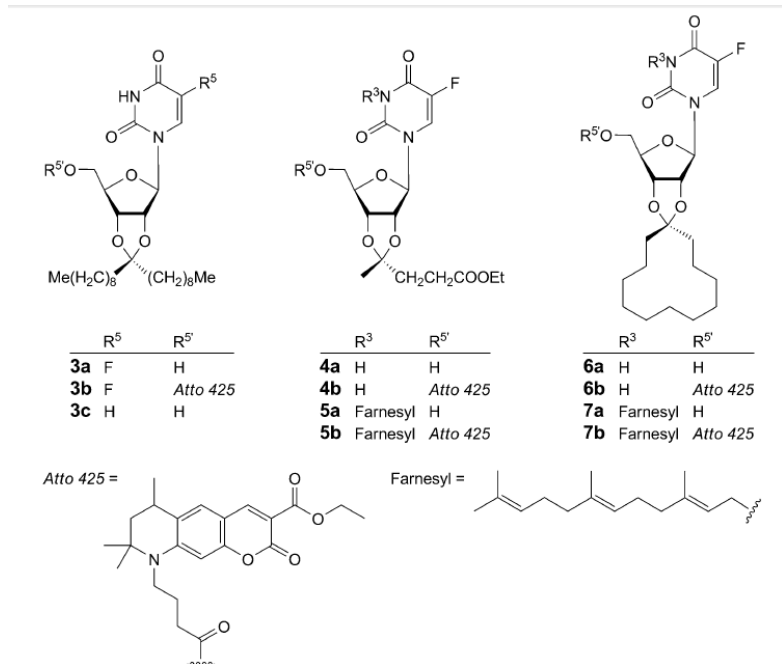


Abbildung 10: Struktur der 5-FUrd Derivate 3a–7a, sowie der ATTO 425®-kunjugierte 5-FUrd Derivate 3b–7b und des Uridin Derivates 3c (Malecki et al. 2013a)

4.3 Intrazelluläre Lokalisation der ATTO 425[®] markierten Substanzen

Um zu untersuchen, ob die Substanzen die Zellmembran passieren können und in welchem Zellkompartiment sie danach lokalisiert sind, wurde die HT-29-Zelllinie mit ATTO 245[®]-markierten Test-Substanzen inkubiert.

4×10^4 humane HT-29-Zellen (Passage 8-9) in 400 μ l Medium pro Well wurden in 8-Well Silikoneinsätzen auf sterilen Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden 24 h inkubiert und die zu testenden Substanzen in einer Konzentration von 20 μ M hinzugefügt. Getestet wurden die mit ATTO 245[®] markierten Konjugate 2c und 3b-7b. Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4% PFA fixiert. Die Silikoneinsätze wurden entfernt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger mit Pro Long[®] Gold antifade reagent eingedeckt. Nun erfolgte eine Analyse der Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe eines speziellen ATTO-Filters (Ex. 436 nm / Em. 484 nm). Die Zellen wurden mit einem Axio Image.M2 Mikroskop fotografiert mit einem digitalen hochauflösenden Bildbearbeitungssystem AxioCam HRC/ Axio Vision Rel 4.8. Die digitalisierten Bilder wurden durch eine standardisierte Bildverarbeitungssoftware bearbeitet und beschriftet.

4.4 Viabilität-Assay

Die Messung der Zytotoxizität der Substanzen erfolgte mittels PrestoBlue[™] Viabilität-/Zytotoxizität-Assays (Boncler et al. 2014).

5×10^3 humane HT-29-Zellen (Passage 5-8) wurden in 96-Well Platten in 100 μ l Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. Die HT-29-Zellen weisen eine Verdopplungszeit von 48 h auf, sodass zu Versuchsbeginn ca. $7,5 \times 10^3$ Zellen pro Well vorhanden waren. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Es wurden 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivate 3a-7a und 3c, sowie die mit ATTO 425[®] konjugierten Derivate 2c, 3b-7b zur Testung verwendet. Es wurden je 4 unabhängige Experimente durchgeführt und pro Behandlung und Experiment wurden 4–6 Wells verwendet.

Die in DMSO gelösten Substanzen wurden in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M getestet. Als Negativkontrollen wurden Zellen zum einen nur in Medium (100% der Viabilität) und zum anderen mit Medium und 0,4% DMSO kultiviert (Miret et al. 2006). Für die ATTO 425[®]-konjugierten Derivate wurden Zellen nur mit ATTO 425[®] als weitere Negativkontrollen kultiviert.

Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurde die Viabilität der Zellen gemessen. Hierfür wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und anschließend in die Wells 10% PrestoBlue™ reagent zum Medium hinzugefügt. PrestoBlue™ ist eine Weiterentwicklung von alamarBlue® und ist sensibler als dieses. AlamarBlue® ist ein Redox-Indikator für Enzymaktivität. Es wird für das Screening von Viabilität/Zytotoxizität in Organismen verwendet (Al-Nasiry et al. 2007, Bull et al. 2001, Hamid et al. 2004, Sykes & Avery 2009, van der Harst, M R et al. 2005). In lebenden, metabolisch aktiven Zellen wird PrestoBlue™ reduziert, sodass in kurzer Zeit eine quantitative Messung der Viabilität der Zellen, mittels optischer Absorption, durchgeführt werden kann. Die Messung der Viabilität der Zellen erfolge nach dem Protokoll von Invitrogen-Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany. Anschließend wurden die Platten für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h inkubiert und die optische Dichte (OD) mit Hilfe des SUNRISE ELISA-Readers bei 570 nm und 600 nm (als Kontrolle) gemessen. Die Ergebnisse werden in

% Viabilität = (Probe OD_(570 nm – 600 nm reference) *100) / Kontrolle OD_(570 nm – 600 nm reference) gezeigt.

Der Versuch wurde in gleicher Weise mit den anderen Zelllinien wiederholt (Tab. 8). In je 100 µl Medium pro Well wurden folgende wurde in 96-Well Platten ausgesät: 15 x 10³ humane THP-1 (Passage 6-9) Makrophagen [die mit PMA (phorbol myristate acetate)-differenziert wurden], 5 x 10³, RENCA-Zellen (Passage 4-7) und 5 x 10³ humane HepG2 Zellen (Passage 5-8). Getestet wurden 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivate 3a-7a und 3c in den Konzentrationen 10 µM, 20 µM, 40 µM und 80 µM. Nach 48 h Inkubation wurde die Viabilität der Zellen mit 10% PrestoBlue™ reagent mit Hilfe eines SUNRISE ELISA-Readers gemessen.

Zelllinie	Substanz	Kontrolle	Inkubationszeit
HT-29	1, 2a, 3a-7a, 3c	Medium, 0,4% DMSO	24 h, 48 h, 72 h
HT-29	2c, 3b-7b	ATTO 425® 1-fache und 3-fache Konzentration	24 h, 48 h, 72 h
THP-1	2a, 3a-7a, 3c	Medium 0,4% DMSO	48 h
RENCA	1, 2a, 3a-7a, 3c	Medium, 0,4% DMSO	48 h
HepG2	1, 2a, 3a-7a, 3c	Medium, 0,4% DMSO	48 h

Tabelle 8: Versuchsaufbau des Viabilität-/Zytotoxizität-Assays

4.5 Apoptose-Assay

Es wurden 1×10^4 humane HT-29-Zellen (Passage 5-7) in 100 μ l Medium pro Well auf 96-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert. Anschließend wurden diese mit den zu testenden Substanzen 5-FU (1), 5-FUrd (2a), 3a-7a und 3c inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit Medium bzw. mit Medium und 0,4% DMSO behandelt. Die zu untersuchende Substanzen wurden in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M getestet. Der Versuch wurde in Doppelbestimmung ausgeführt. Nach 1 h, 2 h, 4 h und 6 h Inkubation wurden die Platten mit YO-PRO[®]-1 Iodide in der Konzentration 1:1000 und Hoechst 33342 in der Konzentration 1:2000, gefärbt.

YO-PRO[®]-1 Iodide ist ein grün fluoreszierender DNA intercalant-Farbstoff, der nicht zellmembranpermeabel ist, aber in apoptotische Zellen eindringen und diese so sichtbar machen kann (Idziorek et al. 1995). Als Gegenfärbung wurde Hoechst 33342 benutzt. Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der blau fluoresziert, wenn er an dsDNA bindet. Der Farbstoff durchdringt auch die Membran lebender Zellen und färbt ihre Kerne (Arndt-Jovin & Jovin 1977).

Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit einem speziellen Filter für YO-PRO[®]-1 Iodide (FITC) und Hoechst 33342 (DAPI) analysiert. Hoechst 33342 hat die Anregung bei 350 nm und die Emission bei 461 nm, sodass dieser Fluoreszenzfarbstoff mit einem DAPI-Emissionsfilter detektiert werden kann. Der Farbstoff YO-PRO[®]-1 Iodide hat die Anregung bei 491 nm und die Emission bei 509 nm. YO-PRO[®]-1 Iodide und kann mit dem FITC-Filter detektiert werden (Abb. 11).

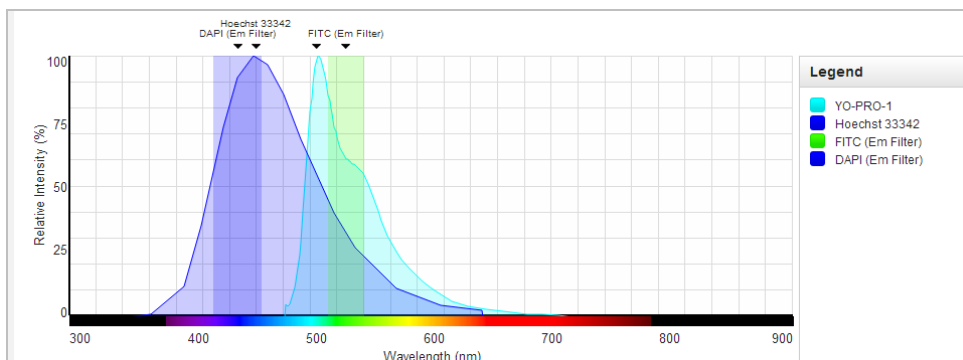


Abbildung 11: Fluorescence Spectral Viewer; Life Technologies
(www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html)

Die Zellen wurden mit einem Axio Image.M2 Mikroskop fotografiert unter Zuhilfenahme eines digitalen hochauflösenden Bildbearbeitungssystems AxioCam HRc/ Axio Vision Rel 4.8. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit ZEN 201 Software.

4.6 Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Um den Einfluss der Substanzen auf die Expression von Genen der humanen HT-29-Zellen zu analysieren, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang Apoptose-induzierende bzw. Proliferations-relevante Gene.

4.6.1 RNA-Isolierung

Zur Gewinnung des Materials wurden 25×10^4 HT-29-Zellen (Passage 7-10) in 6-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend die Substanzen hinzugefügt. Verwendet wurden die Substanzen 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivate 3a-7a, 3c, eine Negativkontrolle nur mit Medium und eine Kontrolle mit 0,2% DMSO in Medium. Die Konzentration der Substanzen betrug 40 µM. Nach der Zugabe der Substanzen wurden die Zellen für 6 h im Brutschrank inkubiert. Es wurden pro Substanz zwei Ansätze ausgesät, um genügend Zellmaterial für die Realtime PCR zu erhalten, bei einer Zelldichte, die den Versuchen in den 96-Well Platten entsprach.

Die RNA-Extraktion erfolgte nach der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode, nach dem Protokoll von peqGOLD TriFast™ (Fa. Peqlab).

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen auf Eis gestellt und unter dem Abzug vorsichtig mit einer Pipette das Medium abgenommen. Es wurden pro Well 500 µl peqGOLD TriFast™ auf die Zellen gegeben, um RNA zu extrahieren. Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber vom Boden des Wells gelöst, mit der Pipette aufgenommen und in ein steriles RNase- und DNase-freies 2 ml Eppendorfcup überführt. Anschließend erfolgte eine Spritzen-Passage, um die Suspension zu homogenisieren und die Zellen aufzulösen.

Um die Proben zu trennen, wurden diese 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Proben wurden pro verwendeten Milliliter peqGOLD TriFast™ 0,2 ml Chloroform gegeben und danach die Cups 15 sec. geschüttelt. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden sie für 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, um eine Phasenauftrennung zu bekommen.

Durch das Zentrifugieren entstanden drei Phasen: unten im Cup befand sich eine rote Phenol-Chloroform-Phase, eine weißliche Interphase in der Mitte, und oben eine farblose Phase. In der unteren und mittleren Phase befanden sich die DNA und die Proteine. In der oberen farblosen, wässrigen Phase befand sich die für uns relevante Gesamt-RNA. Diese wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues steriles RNase- und DNase-freies Cup gegeben. Die anderen Phasen wurden verworfen. Die Phasentrennung durch das Chloroform wurde noch einmal wiederholt, um eine mögliche Verunreinigung durch DNA oder Proteine so gering wie möglich zu halten.

Um die RNA zu präzipitieren, wurden 0,5 ml 100% Isopropanol pro eingesetzten Milliliter peqGOLD TriFast™ hinzugefügt und die Proben für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Unten im Cup war nach der Zentrifugation das RNA-Pellet lokalisiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet durch Zugabe von 500 µl 70% Ethanol durch Vortexen und anschließender 10 minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C gewaschen.

Nach Abnahme des Ethanolüberstandes trocknete das RNA-Pellet an der Luft unter dem Abzug. Anschließend wurde es in 20 µl pro Cup RNase-freiem, ultrapurem Wasser aufgenommen und mehrmals resuspendiert. Um die Lösbarkeit zu verbessern wurden die Proben für 10 min auf 55-60°C im Wasserbad erhitzt und anschließend die Proben bei -80°C gelagert.

4.6.2 Kontrolle der RNA-Qualität und -Integrität

Mit dem NanoDrop 2000c, einem Spektralphotometer, wurde die Konzentration der RNA und deren Reinheit gemessen, unter Verwendung von 1 µl Probe. RNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Proteine haben ihr Maximum bei 280 nm. Die Reinheit einer Probe wurde mit Hilfe des $A_{260/280}$ Verhältnisses bestimmt. Weitgehend proteinfreie Lösungen haben einen Quotienten von 1,8 und 2,0. Ist eine Probe zum Beispiel durch Proteine verunreinigt, ist die Extinktion bei 280 nm erhöht und damit der $A_{260/280}$ Extinktionsquotient erniedrigt (Gallagher & Desjardins 2008). Der $A_{260/280}$ Extinktionsquotient unserer Proben lag zwischen 1,67 und 1,98.

Für die Bestimmung der RNA-Integrität wurde das Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay verwendet. Die Integrität der RNA wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyzer, ein microfluidics Chips-based platform gemessen (Abb. 12).

Als Maß für die Integrität gilt die RNA Integrity Number (RIN). Ist die RNA völlig intakt liegt die RIN bei 10. Ist die RNA völlig degradiert, liegt die RIN bei 1 (Schroeder et al. 2006). Die RIN-Werte unserer Proben lagen zwischen 10 und 6,4 (Abb. 12).

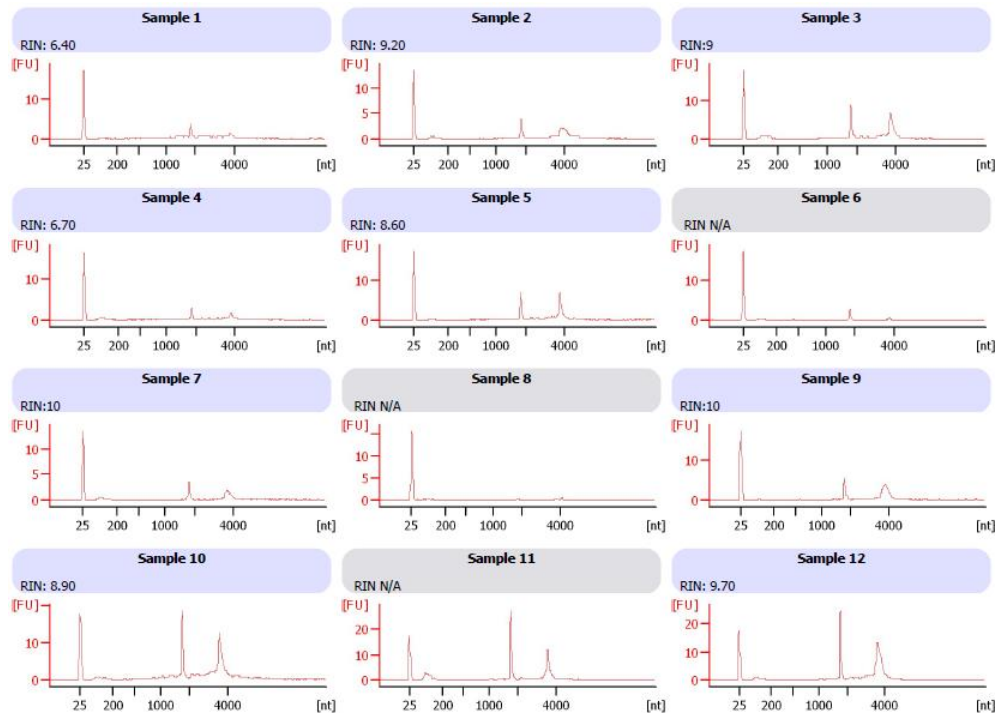


Abbildung 12: Darstellung der RIN-Werte, Sample 1: 4a, Sample 2: 6a, Sample 3: 3a, Sample 4: 5a, Sample 5: 7a, Sample 6: 5-FU (1), Sample 7: 2a, Sample 8: 3c, Sample 9: DMSO, Sample 10: Negativkontrolle, Sample 11: Doppelbestimmung von Substanz 5-FU (1), Sample 12: Doppelbestimmung der Negativkontrolle

4.6.3 Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA)

Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase, unter Verwendung eines Primers, in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde nach dem Protokoll von Agilent Technologies vorgegangen.

Zunächst wurde ein „DNase I-Verdau“ durchgeführt, um eine eventuelle Verunreinigung der Probe mit DNA ausschließen zu können. Hierbei wurde nach dem Protokoll der Firma Fermentas vorgegangen.

Dazu wurde 1 µg der total RNA, das in max. 7,5 µl Wasser mit Ribolock gelöst sein darf, benötigt. Es wurde zu jedem Cup je 1 µl Reaktionspuffer (100 mM TRIS, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) und 1,5 µl DNase I hinzugefügt. Die Proben wurden für 30 min bei 37°C im Hitzeblock, dem MJ Research PTC-200 Thermocycler, inkubiert. Anschließend wurden 1 µl 50 mM EDTA zu jeder Probe hinzugefügt und danach für weitere 10 min bei 65°C inkubiert, um die DNase I zu inaktivieren. Nach Abschluss des „DNase I-Verdaus“ wurden die Probe auf Eis gestellt.

Danach wurde zu jedem Cup ein 1 µl Oligo (dT)₁₈-Primer und 1,7 µl ultrapures RNase-freies Wasser gegeben. Der Oligo (dT)₁₈-Primer ist ein einfacher DNA-Strang, aus 18 Thymidinbasen mit einem 5'- und einem 3'-Ende. Er bindet an den Poly-A-Schwanz der mRNA. Die Cups wurden anschließend für 5 min auf 65°C erhitzt und über einen Zeitraum von 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden sie auf Eis gestellt. Nach der Inkubationszeit wurde zu jeder Probe hinzugefügt:

- 2 µl 10x A.Script Puffer
- 2 µl 100 mM DTT
- 0,8 µl 100 mM dNTP Mix
- 1 µl AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transkriptase
- 0,5 µl Ribolock.

Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 20 µl pro Cup. Die Cups wurden für 60 min bei 42°C im Hitzeblock inkubiert und für 15 min bei 72°C inaktiviert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und bei -20°C eingefroren.

4.6.4 Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT- PCR)

Bei der qRT-PCR werden die cDNA-Moleküle der Proben amplifiziert, unter Zuhilfenahme einer Taq-Polymerase und spezifischen Primern. Bei diesem Verfahren kann bestimmt werden, ob und in welchem Maß die Expression der gesuchten mRNA in der Probe vorhanden ist (Abb. 13). Nach jedem Zyklus wird die Anzahl der neu synthetisierten Moleküle erfasst. Dies geschieht mit Hilfe von SYBR green, ein fluoreszierender Farbstoff, der an die doppelsträngige cDNA bindet. Je weniger Zyklen benötigt werden, um eine detektierbare Fluoreszenz herzustellen, umso größer ist die Anzahl der gesuchten cDNA-Moleküle in der Probe (Higuchi et al. 1993). Jener Zyklus, bei dem die Detektionsschwelle des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs überschritten wird, heißt: threshold cycle (Ct). Die Arbeit erfolgte unter der „UV Sterilizing PCR Workstation“. Die Primer wurden zunächst abzentrifugiert und in 1,1 ml TE-Puffer gelöst. Es wurden 50 µl Aliquots in sterilen RNase- und DNase-freien Cups erstellt und diese bei -20°C aufbewahrt.

Im ersten Schritt wurde die cDNA der Proben 1:10 mit RNase ultrapurem RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt. Der Standard der Proben, der aus einem Mix aller Proben besteht, wurde mit ultrapurem RNase- und DNase- freiem Wasser auf 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320 verdünnt.

Dem 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix wurden 6 µl des 1:1000 verdünnten (mit ultrapurem RNase- und DNase- freiem Wasser) ROX Reference dye zugefügt. Anschließend wurde ein SYBR®-Green-QPCR-Lösungsansatz hergestellt aus:

- je 7,5 µl 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix/ Reaktion
- je 1,5 µl Primer/Reaktion
- je 1 µl ultrapures RNase- und DNase-freies Wasser/Reaktion

Von diesem Reaktionsansatz wurden mit einer Multipette 10 µl/Well in die QPCR 96-Well Platte vorgelegt. 5 µl/Well der Proben oder des Standards wurden hinzugefügt. Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung. Anschließend wurden die Wells verschlossen und für 1 min bei 1000 x g in einer „Perfect spin P“ Zentrifuge zentrifugiert. Abschließend wurde die Platte in den PCR-Block Mx3005P QPCR System gestellt und die Amplifizierung wurde gestartet. Verwendet wurde die MxProQPCR Software.

Es wurde das Thermalprofil des 2x Brilliant III Ultra Fast SYBR®Green Master Mix verwendet (Tab. 9).

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	10 sek	42
Annealing/Elongation	60°C	20 sek	1
Schmelzkurvenanalyse	95°C von 55°C bis 95°C	1 min für je 30 sek (insg. 20 min)	1

Tabelle 9: qRT-PCR: Thermalprofil

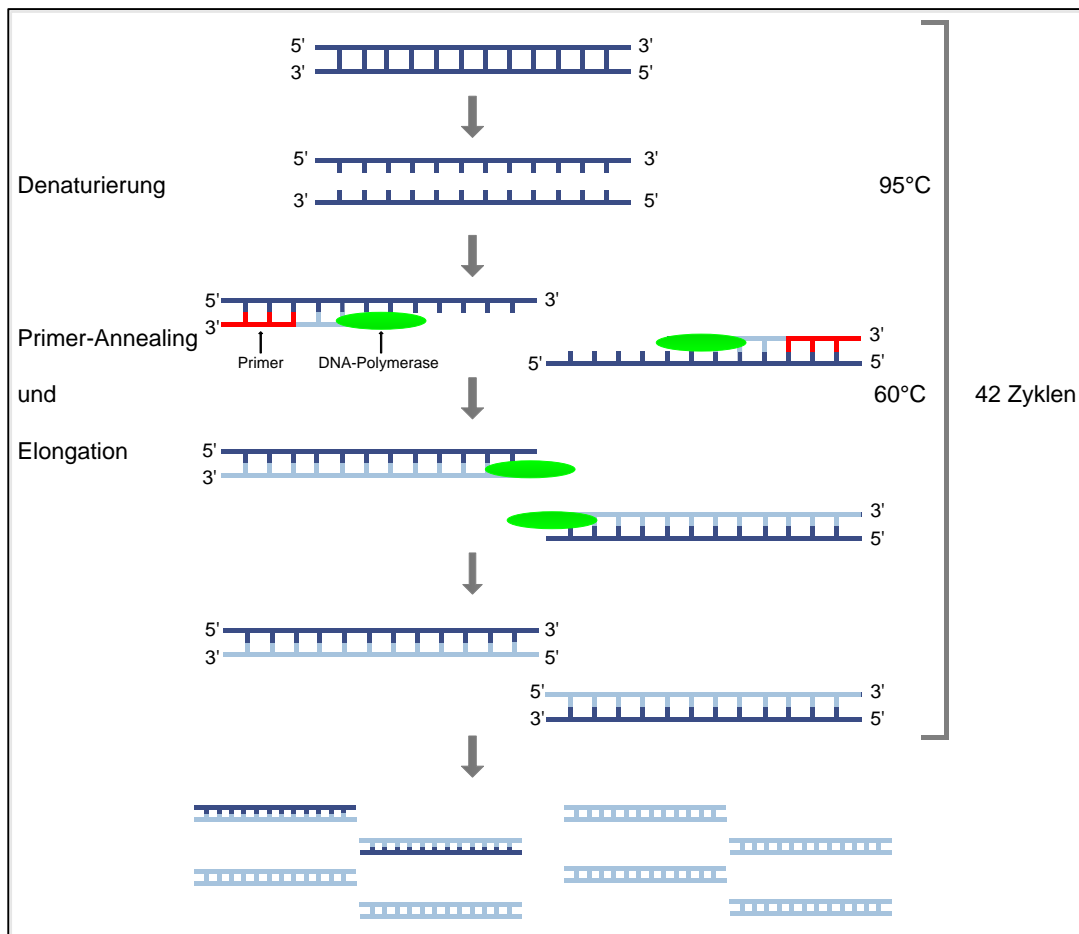


Abbildung 13: Schematische Darstellung der PCR (Joppien, S. , Maier, S. , Wendling, D. 2011)

Die Proben wurden im Thermocycler einmalig für 3 min auf 95°C erhitzt, um die doppelsträngige cDNA der Proben initial zu denaturieren.

Bei 60°C erfolgte die Hybridisierung des Primers an die DNA-Matrizen (Template) und die Elongation durch die Taq-Polymerase. Die Synthese startete am 3'-Ende und erfolgte komplementär zum Template. Anschließend wurden die Proben wieder für 10 sek auf 95°C erhitzt, um die Proben erneut zu denaturieren. Dieser Ablauf wurde in 42 Zyklen wiederholt. Abschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die Proben alle 30 sek um 1°C erhitzt, von 55°C bis auf 95°C. Durch das Erhitzen denaturieren die cDNA-Doppelstränge und der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wird dadurch frei. Die Proben denaturieren bei einer spezifischen Temperatur. Da die Primerdimere und nicht erwünschten Amplifikationsprodukte bei einer anderen Temperatur denaturieren als die Proben ist so eine Unterscheidung möglich. Die relative Quantifizierung der Daten erfolgte durch Erstellen einer Standardkurve mit Hilfe des Standards für jedes Gen (Abb. 14). Durch lineare Regression konnten Rückschlüsse auf die cDNA-Konzentration der einzelnen Proben gezogen werden (Bustin 2000).

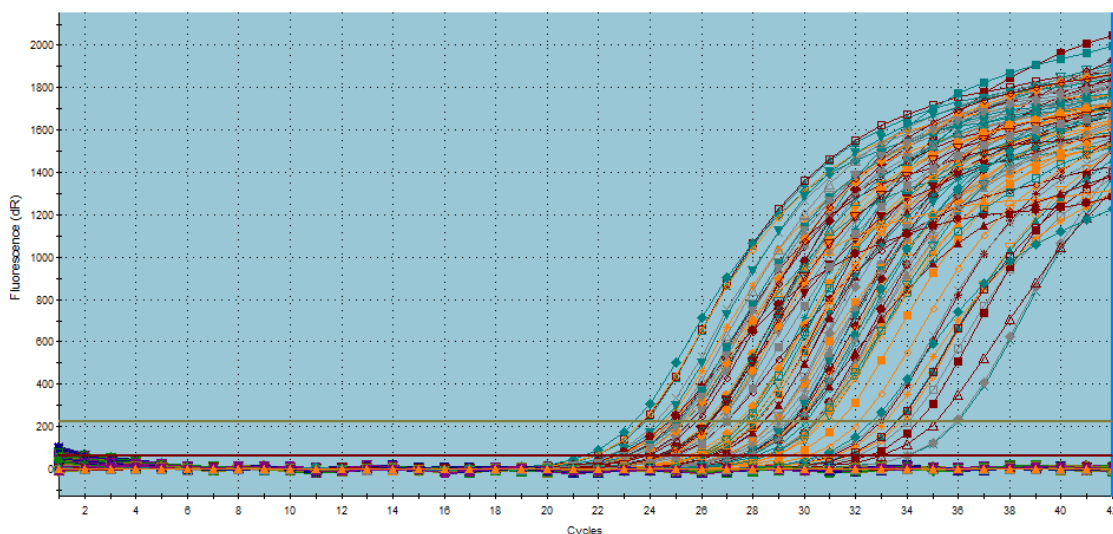


Abbildung 14 : Amplifikationskurven am Beispiel des Tumorsuppressor Tp53 Gens

Anschließend wurde unter Verwendung des Programmes NormFinder.xla (Andersen et al. 2004) aus den getesteten konstitutiv exprimierten „house-keeping genes“ (Haushaltsgene) Actb, B2M und GAPDH jenes herausgesucht, das sich am besten zur Normalisierung eignet (Stern-Straeter et al. 2009). Die Normalisierung der cDNA erfolgte durch Bezugnahme der Expression der Ziel-DNA auf GAPDH.

4.7 Statistische Auswertung

Die Sigma Plot Software wurde zur statistischen Analyse verwendet. Es wurden ein ungepaarter t-Test und der Wilcoxon-Mann-Whitney Test durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Intrazelluläre Lokalisation der ATTO 425[®] markierten Substanzen

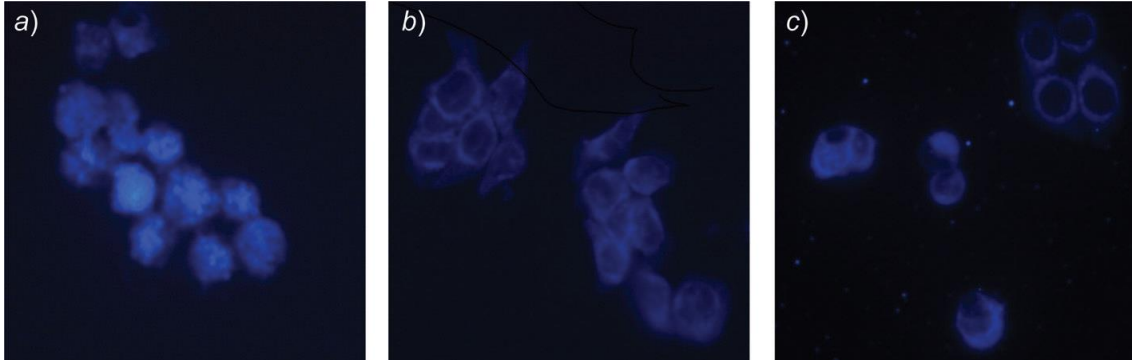


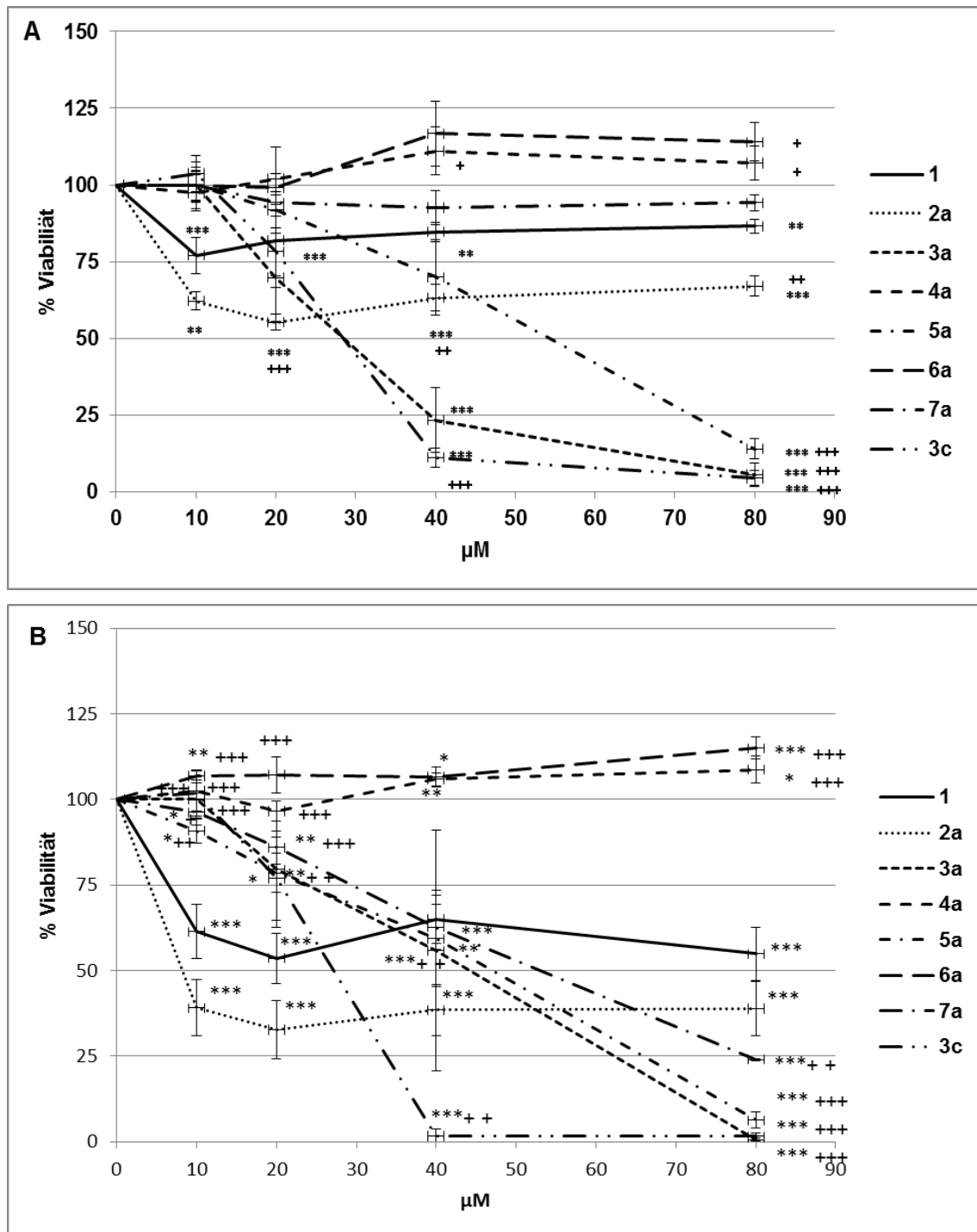
Abbildung 15: Repräsentative Bilder der intrazellulären Lokalisation des ATTO 425[®]-konjugierten 5-FUrd (2c) und dessen Derivaten 4b und 5b in humanen HT-29-Zellen nach 24 h Inkubation, 200-fache Vergrößerung. a) 2c, b) 4b, c) 5b (Malecki et al. 2013a)

Abbildung 15 zeigt einige repräsentative Beispiele der intrazellulären Lokalisation der 5'O-gebundenen ATTO 425[®] Derivate.

Alle Derivate wurden in die humanen HT-29-Zellen aufgenommen und reicherten sich homogen im Zytoplasma an. Das ATTO 425[®]-konjugierte 5-Fluorouridin (2c) zeigte eine granulierte Verteilung im Zytoplasma (Abb. 15a). Alle anderen 5'O-gebundenen ATTO 425[®]-Derivate wiesen eine Aussparung im Bereich des Zellkerns auf, beispielhaft dargestellt an den Derivaten 4b (Abb. 15b) und 5b (Abb. 15c)

5.2 Viabilität-Assay

5.2.1 Viabilität der HT-29-Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit den Substanzen 1, 2a, 3a-7a bzw. 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)



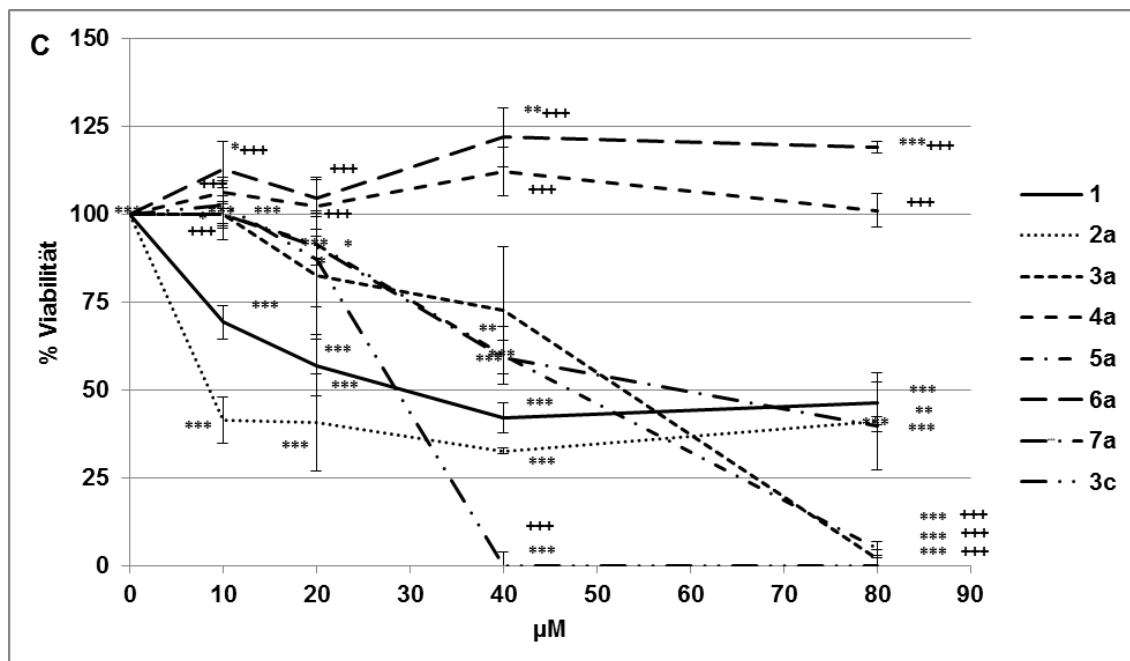


Abbildung 16: Viabilität/Überleben humaner HT-29-Kolonkarzinomzellen nach 24 h (A) (Malecki et al. 2013a), nach 48 h (B) (Farhat et al. 2014) und nach 72 h (C) (Farhat et al. 2014) Inkubation mit 5-FU (1) (als Positivkontrolle), 5-FUrd (2a), bzw. dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in % Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p < 0,05$, ++: $p < 0,01$, +++: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=4**

Die 5-Fluorouridinderivate wurden auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber den Krebszellen getestet im Vergleich zur Negativkontrolle (nur in Medium kultiviert, 100% Viabilität) und im Vergleich zu den Effekten von 5-FU (1) bzw. 5-FUrd (2a) als Positivkontrolle.

In Abbildungen 16 sind die Effekte der getesteten Substanzen 1, 2a, 3a-7a und 3c nach 24 h (A), 48 h (B) und nach 72 h (C) auf die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 dargestellt. In den Negativkontrollen mit Medium und 0,4% DMSO zeigten sich in allen Experimenten keine zytotoxischen Effekte durch DMSO (nicht gezeigt)

Nach 24 h Inkubationszeit zeigte 5-FU (1) in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M eine signifikante Reduktion der Viabilität in HT-29-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle um 23,0% ($p < 0,001$), 18,1% ($p < 0,001$), 15,3% ($p < 0,01$), und 14,0% ($p < 0,01$) (Abb. 16A). Bei 5-FUrd (2a) konnte nach 24 h Inkubationszeit bei den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M eine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (100% Viabilität) um

38,0% ($p < 0,01$), 45,0% ($p < 0,001$), 37,0% ($p < 0,001$) und 33,1% ($p < 0,001$) beobachtet werden (Abb. 16A). Substanz 2a zeigte in den Konzentrationen 20 μM , 40 μM , und 80 μM im Vergleich zu 5-FU (1) (Positivkontrolle) eine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 26,70%, ($p < 0,001$), 21,6% ($p < 0,01$) und 9,6% ($p < 0,01$) (Abb. 16A).

Bei dem Derivat 3a konnte in den Konzentrationen 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 77,0% und 95,0% beobachtet werden (Abb. 16A). Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) konnte beim Derivat 3a in den Konzentrationen 40 μM und 80 μM eine Reduktion der Viabilität der HT-29-Zellen um 61,4% und 81,1% ($p < 0,001$) gezeigt werden (Abb. 16A).

Beim 5-Fluorouridinderivat 3c konnte in den Konzentrationen 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Viabilität der HT-29-Zellen um 89,0% und 96,0% gezeigt werden (Abb. 16A). Das Derivat 3c zeigte in den Konzentrationen 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 80,3% und 82,2% (Abb. 16A).

Das Derivat 5a erzielte bei 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Negativkontrolle eine 30,0%- bzw. 86,0%-ige ($p < 0,001$) Hemmung der Viabilität der HT-29-Zellen (Abb. 16A). Des Weiteren konnte bei Derivat 5a bei 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 73,0% beobachtet werden (Abb. 16A).

Anders verhielten sich die Derivate 4a und 6a. Diese zeigten keine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle (Abb. 16A). Es zeigte sich sogar in den Konzentrationen 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle eine Zunahme der Viabilität der HT-29-Zellen 4a: 26,4% ($p < 0,05$), 21,0% ($p < 0,05$), 6a: 32,0%, 27,4% ($p < 0,05$) (Abb. 16A).

Bei dem Derivat 7a wurde nach 24 h Inkubation mit den Konzentrationen 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle keine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen beobachtet (Abb. 16A).

Bei 5-FU (1) konnte nach 48 h Inkubation in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Negativkontrolle (100% Überleben) eine signifikante Reduktion der Viabilität der HT-29-Zellen um 38,7% ($p < 0,001$), 46,4% ($p < 0,001$), 35,1% und 45,1% ($p < 0,001$) beobachtet werden (Abb. 16B).

Auch 5-FUrd (2a) zeigte nach 48 h Inkubationszeit in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 60,9%, 67,20%, 61,4% und 61,1% (Abb. 16B).

Zwischen 5-FU (1) und 5-FUrd (2a) bestand bezüglich Einfluss auf die Viabilität der HT-29-Zellen kein signifikanter Unterschied (Abb. 16B).

Bei dem Derivat 3a konnte in den Konzentrationen 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine Abnahme der Viabilität um 20,5%, 44,2% ($p < 0,001$) und um 99,4% ($p < 0,001$) beobachtet werden (Abb. 16B). Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) wurde bei 3a in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M eine Reduktion der Viabilität der HT-29-Zellen um 9,1% ($p < 0,01$) und 54,3% ($p < 0,001$) gefunden (Abb. 16B).

Das Derivat 5a reduzierte in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle jeweils um 9,2% ($p < 0,05$), 21,5% ($p < 0,01$), 40,7% ($p < 0,01$) und 93,7% ($p < 0,001$) (Abb. 16B).

Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) zeigte sich bei dem Derivat 5a in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M eine Abnahme des Überlebens um 5,6% und um 48,6% ($p < 0,001$) (Abb. 16B).

Bei dem Derivat 7a wurde nach 48 h Inkubationszeit mit den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 3,7%, 14,1% ($p < 0,01$), 37,3% ($p < 0,001$) und 76,0% ($p < 0,001$) gemessen (Abb. 16B).

Im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich bei 7a in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M eine Verminderung der Viabilität um 2,2% und um 30,9% ($p < 0,01$) (Abb. 16B).

Das 5-Fluorouridinderivat 3c wies in den Konzentrationen 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine Reduktion der Viabilität um 23,1% ($p < 0,05$), 98,3% ($p < 0,001$) und 98,4% ($p < 0,001$) auf (Abb. 16B). Im Vergleich zur Positivkontrolle fanden wir bei 3c in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M eine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29 Zellen um 63,21% ($p < 0,01$) und 53,31% ($p < 0,001$) (Abb. 16B). Auch nach 48 h Inkubationszeit fanden wir bei den Derivaten 4a und 6a in allen eingesetzten Konzentrationen keine signifikante Reduktion der Viabilität der HT-29-Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und zur Negativkontrolle (Abb. 16B). Es konnte bei Substanz 4a in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine Zunahme der Zellzahl jeweils um 6,0% ($p < 0,01$) und um 8,7% ($p < 0,05$) beobachtet werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) zeigte das Derivat 4a

in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M eine signifikante Zunahme der Viabilität um 41,1% ($p < 0,001$), 43,0% ($p < 0,001$), 41,0% und 53,8% ($p < 0,001$) (Abb. 16B).

Des Weiteren fanden wir bei dem Derivat 6a in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Zunahme der Viabilität um 6,8% ($p < 0,01$), 7,2%, 6,7% ($p < 0,05$) und um 15,0% ($p < 0,001$) (Abb. 16B). Außerdem wurde bei dem Derivat 6a in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante Zunahme der Viabilität um 45,5% ($p < 0,001$), 53,6% ($p < 0,001$), 41,7 und 60,1 ($p < 0,001$) beobachtet (Abb. 16B).

Nach 72 h Inkubationszeit zeigte 5-FU (1) in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Viabilität um 30,8%, 43,2%, 58,0% und um 53,6% (Abb. 16C).

Bei 5-FUrd (2a) wurde nach 72 h Inkubationszeit in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 58,7%, 59,3%, 67,4% und 58,9% beobachtet (Abb. 16C).

Das Derivat 3a zeigte in den Konzentrationen 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine Abnahme der Viabilität der Zellen um 17,7%, 27,5% und 98,3% ($p < 0,001$) (Abb. 16C). Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) fanden wir bei Derivat 3a in der Konzentration 80 μ M eine Reduktion der Viabilität um 44,7% ($p < 0,001$) (Abb. 16C).

Beim 5-Fluorouridinderivat 5a wurde in den Konzentrationen 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine Reduktion der Viabilität um 8,6%, 40,3% ($p < 0,01$) und 95,2% ($p < 0,001$) gefunden (Abb. 16C).

Das Derivat 5a zeigte in der Konzentration 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle eine Abnahme der Viabilität um 41,5% ($p < 0,001$) (Abb. 16C).

Das Derivat 3c wies bei 40 μ M und 80 μ M eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität um 100% im Vergleich zur Negativkontrolle auf (Abb. 16C). Des Weiteren fanden wir bei Derivat 3c in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität um 42,0% und 46,4% (Abb. 16C).

Bei dem Derivat 7a wurde nach 72 h Inkubation mit den Konzentrationen 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 9,5% ($p < 0,05$), 40,9% ($p < 0,001$) und um 60,4% ($p < 0,01$) gemessen (Abb.

16C). Beim Derivat 7a zeigte sich in der Konzentration 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle eine Abnahme der Viabilität um 6,8% ($p < 0,01$) (Abb. 16C).

Die Derivate 4a und 6a hatten nach 72 h Inkubation keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der HT-29-Zellen im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle (Abb. 16C).

Das Derivat 4a zeigte in den Konzentrationen 10 μM (36,8%, $p < 0,01$), 20 μM (45,2%, $p < 0,05$), 40 μM (70,1%, $p < 0,01$) und 80 μM (54,6%, $p < 0,05$) eine signifikante Zunahme der Viabilität im Vergleich zur Positivkontrolle (1) (Abb. 16C).

Das Derivat 6a zeigte in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Viabilität um 43,7%, 47,6%, 79,8% und um 72,7% (Abb. 16C).

5.2.2 Viabilität der HT-29-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit den Substanzen 2c, 3b-7b in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (2c) und Negativkontrolle (100% Viabilität)

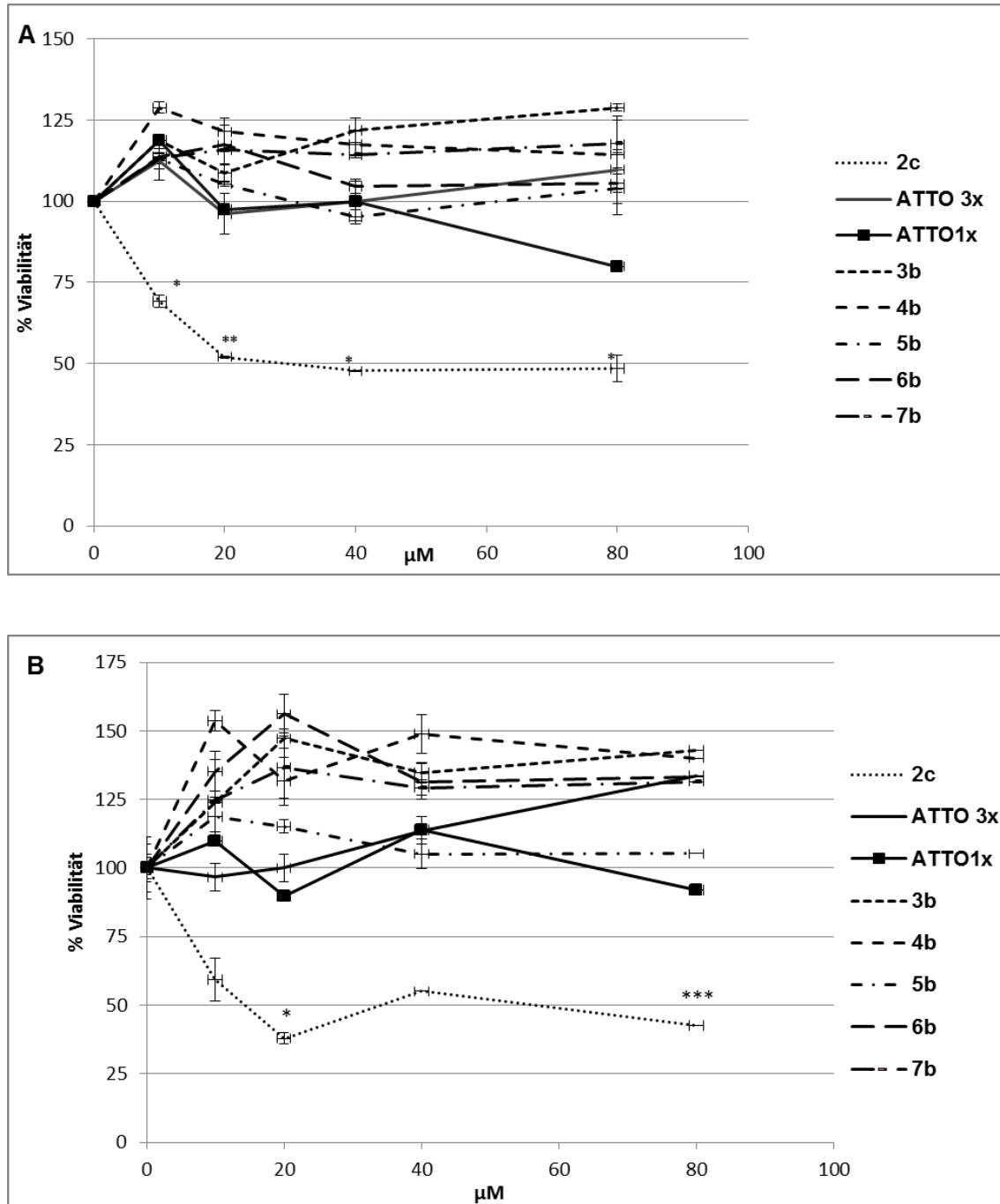


Abbildung 17: Viabilität/Überleben der humanen HT-29-Kolonkarzinomzellen nach 24 h (A) (Malecki et al. 2013a) und nach 48 h (B) Inkubation mit Atto 425[®]-konjugiertem 5-FURd (2c) (als Positivkontrolle) und dessen Derivaten 3b, 4b, 5b, 6b, 7b und ATTO 425[®]. 1 x ATTO= nur ATTO 425[®] (als Kontrolle für die Derivate, an die ein ATTO 425[®]-Molekül konjugiert wurde); 3 x ATTO= dreifache Konzentration des ATTO 425[®] (als Kontrolle für

5-FUrd (2c), an das drei ATTO 425[®] Moleküle gebunden wurden). Die Werte sind angegeben in % Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FUrd (2c, Positivkontrolle). N=4 (Farhat et al. 2014)**

Die mit ATTO 425[®]-konjugierten 5-Fluorouridinderivate 3b, 4b, 5b, 6b und 7b wurden bzgl. ihrer Effekte auf die Viabilität bei humanen HT-29-Kolonkarzinomzellen getestet, nach 24 h und nach 48 h Inkubationszeit (Abb. 17A und 17B).

Wir fanden, dass nach 24 h Inkubationszeit die mit ATTO 425[®]-konjugierten 5-FUrd Derivate 3b, 4b, 5b, 6b und 7b in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt auf die Viabilität aufweisen (Abb. 17A). Das mit ATTO 425[®]-konjugierte 5-FUrd (2c) zeigte in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 31,0% ($p < 0,05$), 48,0% ($p < 0,01$), 52,0% ($p < 0,05$) und 52,0% ($p < 0,05$) (Abb. 17A).

Auch nach 48 h Inkubationszeit zeigten die mit ATTO 425[®]-konjugierten 5-Fluorouridinderivate 3b, 4b, 5b, 6b und 7b bei den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M keine Effekte auf die Viabilität im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 17B). 5-FUrd (2c) reduzierte in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Kontrolle die Viabilität der HT-29-Zellen um 41,0%, 62,1% ($p < 0,05$), 45,0% und 57,4% ($p < 0,001$) (Abb. 17B).

5.2.3 Viabilität der RENCA-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Substanzen 1, 2a, 3a-7a und 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)

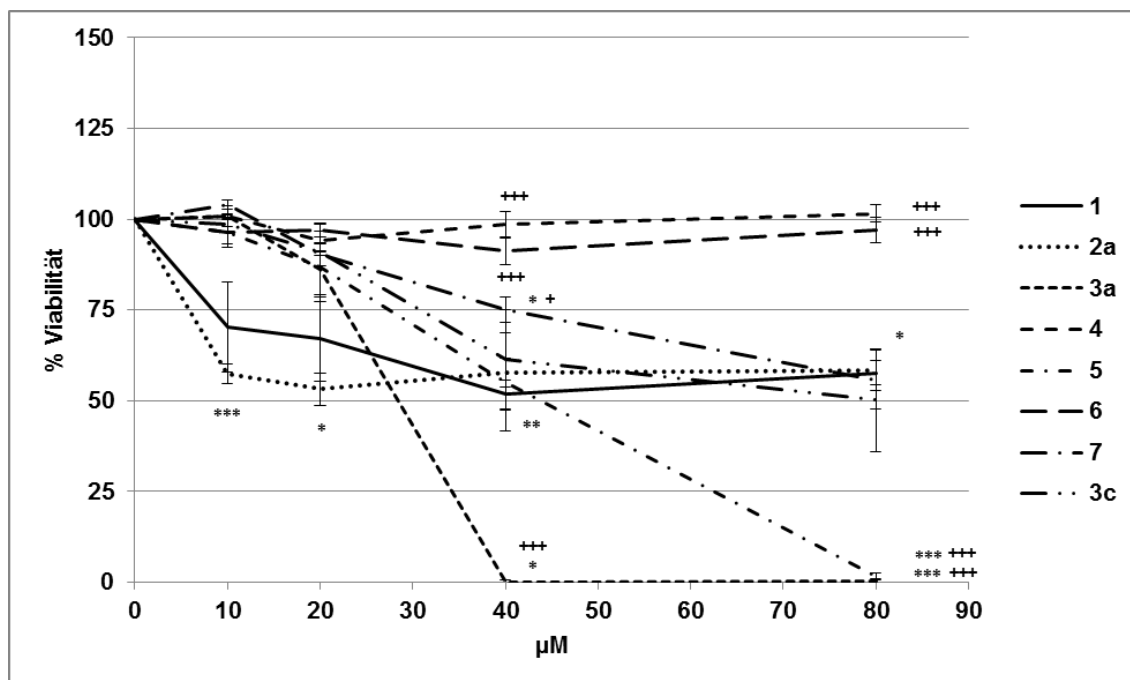


Abbildung 18: Viabilität/Überleben der murinen RENCA-Zellen nach 48 h Inkubation mit 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in % Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=4 (Farhat et al. 2014)**

Um die Effekte der Substanzen 5-FU (1), 5-FUrd (2a), dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a und 3c auf die Viabilität von anderen Krebszellen außer humanen Kolonkarzinomzellen (HT-29) zu untersuchen, verwendeten wir Nierenkarzinomzellen (RENCA) der Maus.

Abbildung 18 zeigt die Effekte der Substanzen 5-FU (1), 5-FUrd (2a), dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c auf die Viabilität der murinen RENCA-Zellen nach 48 h Inkubation. In der Negativkontrolle (Medium + 0,4% DMSO) zeigte sich kein zytotoxischer Effekt durch DMSO (nicht dargestellt).

Bei 5-FU (1) konnte nach 48 h Inkubation in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle (100% Überleben) eine Reduktion der Viabilität der RENCA-Zellen um 29,8%, 32,8%, 48,2% ($p < 0,05$) und 42,4% ($p < 0,05$) beobachtet werden (Abb. 18).

5-FUrd (2a) zeigte nach 48 h Inkubationszeit in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität um 42,6% ($p < 0,001$), 46,9% ($p < 0,05$), 42,3% ($p < 0,05$) und 41,6% ($p < 0,05$) (Abb. 18).

Das 5-Fluorouridinderivat 3a zeigte in den Konzentrationen 40 μ M ($p < 0,05$) und 80 μ M ($p < 0,001$) im Vergleich zur Negativkontrolle eine Reduktion der Viabilität um je 100% (Abb. 18). Bei 3a fanden wir in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der RENCA-Zellen um 51,8% und 57,4% (Abb. 18).

Bei dem Derivat 5a fanden wir in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität um 44,8% ($p < 0,001$) und um 98,5% ($p < 0,01$) (Abb. 18). Das Derivat 5a zeigte in der Konzentration von 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Viabilität um 56,1% (Abb. 18).

Die Derivate 3c und 7a wiesen ähnliche Effekte auf die Viabilität der RENCA-Zellen auf, wie die Substanzen 1 und 2a (Abb. 18).

Das Derivat 3c reduzierte in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle die Viabilität um 38,8% und 49,9% (Abb. 18). Das Derivat 3c verringerte bei 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle (1) die Viabilität um 7,5% (Abb. 18).

Bei dem Derivat 7a konnte nach 48 h Inkubationszeit mit 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität der RENCA-Zellen um 25,0% ($p < 0,05$) und 44,2% beobachtet werden (Abb. 18). Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) reduzierte das Derivat 7a bei 40 μ M die Viabilität signifikant ($p < 0,05$) um 23,3% (Abb. 18).

Bei den Derivaten 4a und 6a zeigten sich in allen Konzentrationen keine signifikante Reduktion der Viabilität der RENCA-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 18). Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) zeigten die Derivate 4a und 6a in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Viabilität der RENCA-Zellen (4a: 46,7% und 44,0%, 6a: 39,5% und 39,4%) (Abb. 18).

5.2.4 Viabilität der HepG2-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Substanzen 1, 2a, 3a-7a und 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)

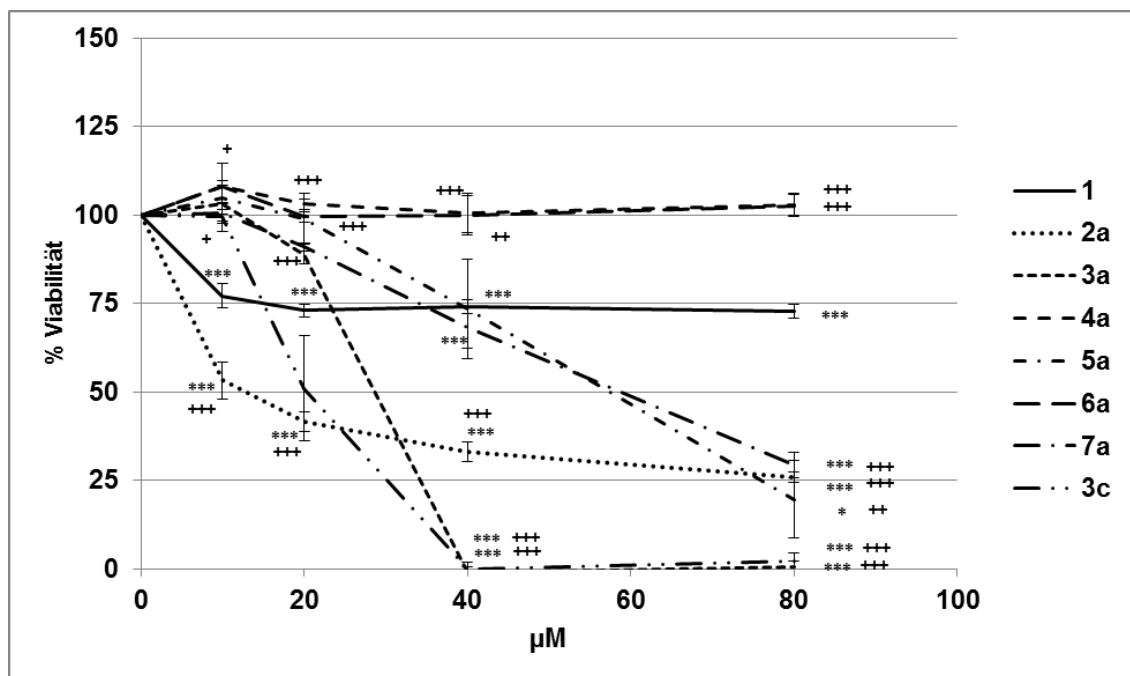


Abbildung 19: Viabilität/Überleben der humanen HepG2-Zellen nach 48 h Inkubation mit 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in % Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p < 0,05$, ++: $p < 0,01$, +++: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=4 (Farhat et al. 2014)**

Die 5-Fluorouridinderivate wurden auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber den humanen HepG2-Krebszellen getestet im Vergleich zur Negativkontrolle (~nur in Medium kultiviert, 100% der Viabilität) und im Vergleich zu den Effekten von 5-FU (1) (~Positivkontrolle) oder 5-FUrd (2a).

In Abbildung 19 sind die Effekte der Substanzen 1, 2a, 3a-7a und 3c nach 48 h auf das Überleben der HepG2-Zellen dargestellt.

In der Negativkontrolle (Medium + 0,4% DMSO) zeigte sich kein zytotoxischer Effekt durch DMSO nach 48 h (nicht dargestellt).

Nach 48 h Inkubationszeit wies 5-FU (1) in den Konzentrationen 10 µM, 20 µM, 40 µM und 80 µM im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Viabilität um 22,9%, 27,1%, 25,9% und um 27,2% auf (Abb. 19).

Bei 5-FUrd (2a) konnte nach 48 h Inkubationszeit in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle (100% Viabilität) eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HepG2-Zellen jeweils um 46,8%, 58,4%, 67,0% und 74,2% beobachtet werden (Abb. 19).

5-FUrd (2a) zeigte in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zu 5-FU (1) (Positivkontrolle) eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HepG2-Zellen um 23,9%, 31,3%, 41,1% und 47,0% (Abb. 19).

Bei dem Derivat 3a konnte in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität lebenden Zellen jeweils um 100% festgestellt werden (Abb. 19). Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) konnte in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M eine Reduktion der Viabilität um 75,1% ($p < 0,001$) und 72,4% ($p < 0,001$) gezeigt werden (Abb. 19).

Das 5-Fluorouridinderivat 3c erzielte in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Viabilität um 100% und 98,0% (Abb. 19). 3c wies in den Konzentrationen 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle eine Abnahme der Viabilität um 22,0%, 74,1% ($p < 0,001$) und 70,8% ($p < 0,001$) auf (Abb. 19).

Das Derivat 5a erzielte in den Konzentrationen 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Hemmung der Viabilität um 26,5% ($p < 0,001$) und 80,4% ($p < 0,05$) (Abb. 19). Des Weiteren konnte bei Derivat 5a in der Konzentration 80 μ M eine Abnahme der Viabilität um 53,2% ($p < 0,01$) im Vergleich zur Positivkontrolle beobachtet werden (Abb. 19).

Bei dem Derivat 7a fanden wir nach 48 h Inkubationszeit bei 40 μ M und 80 μ M Konzentration eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität der HepG2-Zellen um 32,0% und 70,7% im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 19). Das Derivat 7a reduzierte die Viabilität der HepG2-Zellen bei 80 μ M im Vergleich zur Positivkontrolle (1) um 43,5% ($p < 0,001$) (Abb. 19).

Die Derivate 4a und 6a zeigten keine signifikante Abnahme der Viabilität der HepG2-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 19). Es wurde bei beiden Derivaten in den Konzentrationen 10 μ M - 80 μ M positive Effekte auf die Viabilität im Vergleich zur Positivkontrolle (1) beobachtet: Das Derivat 4a zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante Zunahme der Viabilität um 30,9% ($p < 0,05$), 30,1% ($p < 0,001$), 26,4% ($p < 0,001$) und 30,1% ($p < 0,001$) (Abb. 19). Bei dem Derivat 6a konnte im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante Zunahme um 30,9% ($p < 0,01$), 26,5% ($p < 0,001$), 25,8% ($p < 0,01$) und 29,8% ($p < 0,001$) festgestellt werden (Abb. 19).

5.2.5 Viabilität der THP-1-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Substanzen 1, 3a-7a und 3c in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (100% Viabilität)

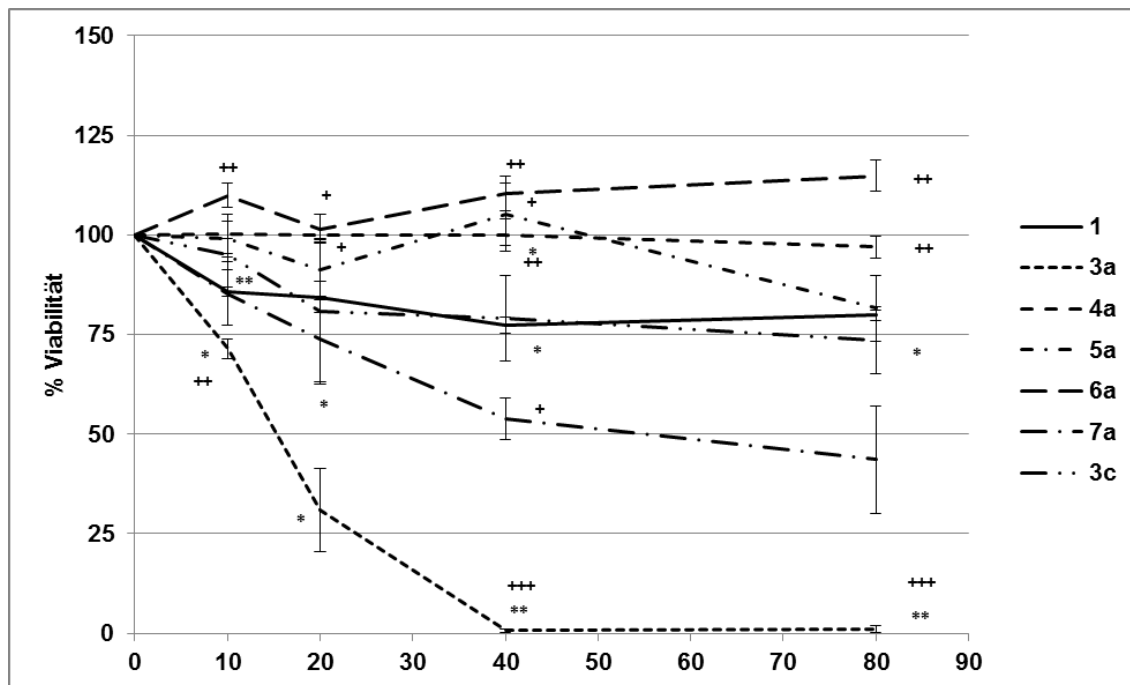


Abbildung 20: Viabilität/Überleben der humanen THP-1-Makrophagen nach 48 h Inkubation mit 5-FU (1) und dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in % Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=3 (Farhat et al. 2014)**

Wir testeten die 5-Fluorouridinderivate auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber humanen mit PMA (phorbol myristate acetate)-differenzierten THP-1-Makrophagen, als ein *in vitro*-Modell zur Differenzierung zwischen zytotoxischen Effekten und Nebenwirkungen. Wir untersuchten die Effekte auf Zell-Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (~nur in Medium kultiviert, 100% der Viabilität) und im Vergleich zu 5-FU (1) (~Positivkontrolle).

Abbildung 20 zeigt die Effekte der Substanzen 5-FU (1) sowie der Derivate 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c auf die Viabilität von PMA-differenzierten THP-1-Makrophagen nach 48 h Inkubation. Bei der Negativkontrolle (Medium + 0,4% DMSO) zeigte sich kein zytotoxischer Effekt nach 48 h (nicht dargestellt). Bei 5-FU (1) konnte nach 48 h Inkubation in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität von THP-1-Makrophagen um

14,4% ($p < 0,001$) 15,6% ($p < 0,01$), 22,7% ($p < 0,001$) und 20,2% ($p < 0,001$) beobachtet werden (Abb. 20).

Das Derivat 3a zeigte in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität der THP-1-Makrophagen um 29,0% ($p < 0,05$), 69,0% ($p < 0,05$), 100,0% ($p < 0,01$) und 98,0% ($p < 0,01$) (Abb. 20). Bei Derivat 3a fanden wir in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine Reduktion der Viabilität der THP-1-Makrophagen um 14,2% ($p < 0,01$), 53,4%, 76,7% ($p < 0,001$) und 78,64% ($p < 0,001$) (Abb. 20).

Beim 5-Fluorouridinderivat 7a konnte in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Negativkontrolle eine Abnahme der Viabilität der THP-1-Makrophagen um 14,7%, 26,2%, 46,1% ($p < 0,01$) und 56,4% ($p < 0,05$), gezeigt werden (Abb. 20). Das Derivat 7a induzierte in den Konzentrationen 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle eine Abnahme der Viabilität der THP-1-Makrophagen um 10,5%, 23,5% ($p < 0,05$) und 36,3% (Abb. 20).

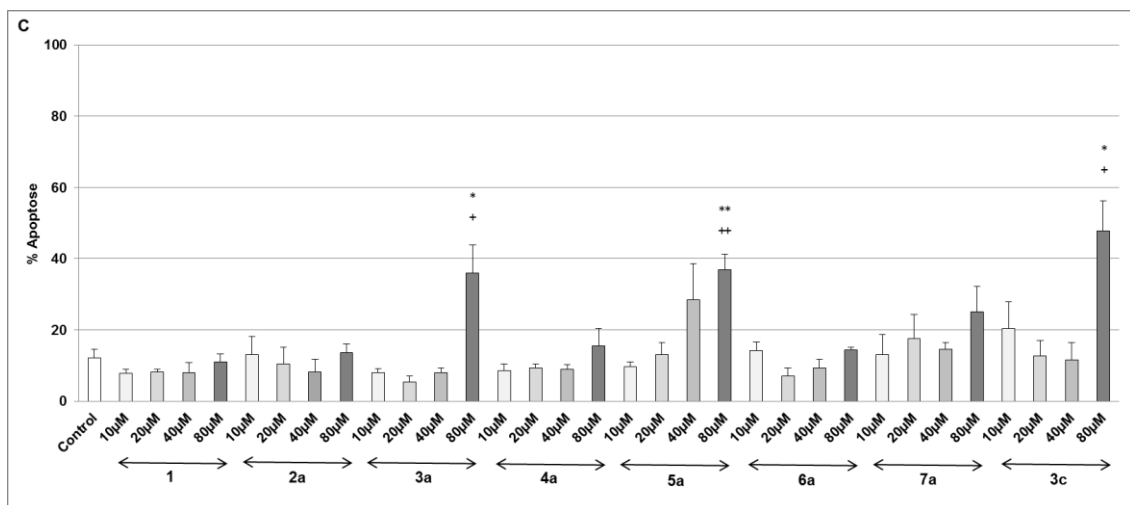
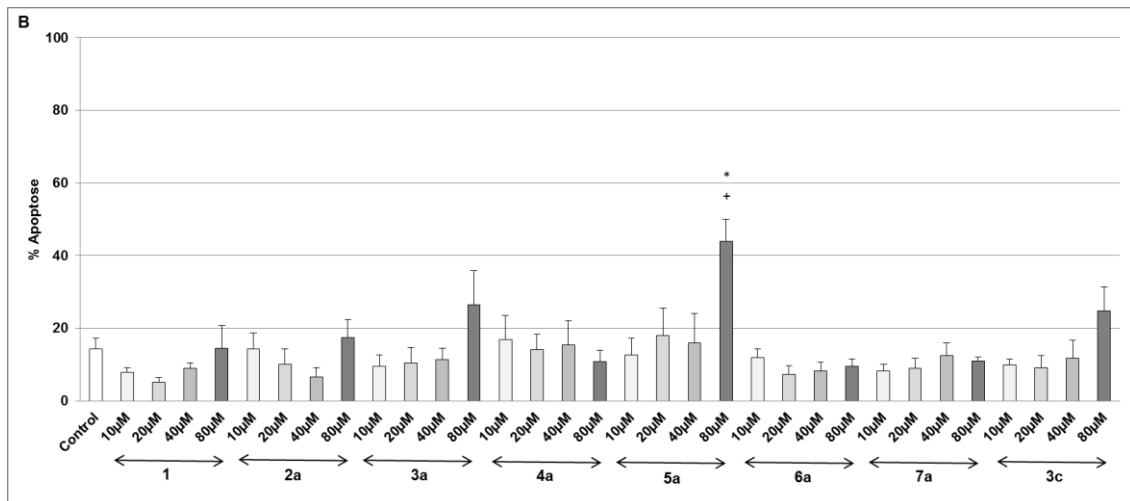
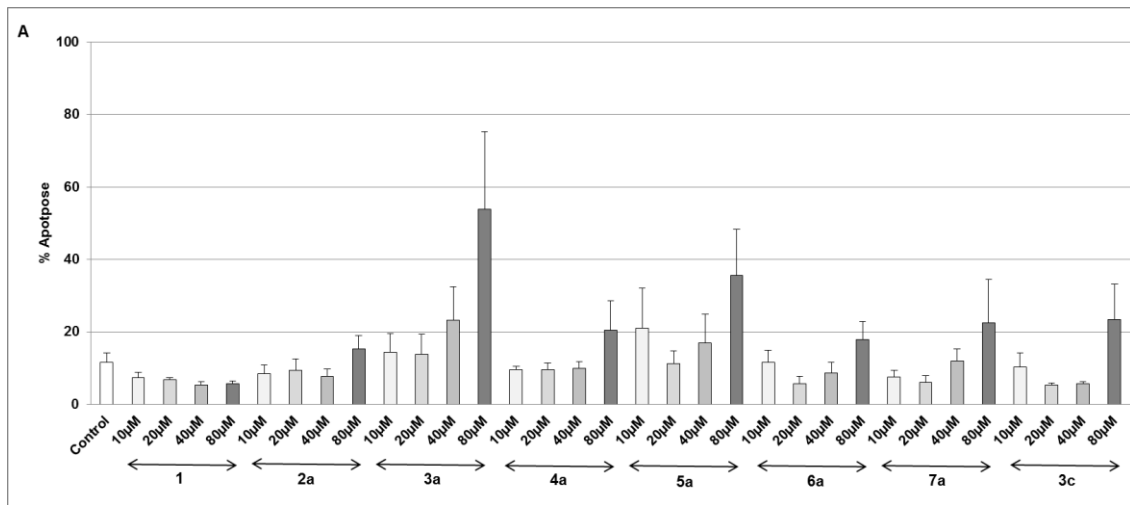
Das Derivat 3c zeigte bei 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Negativkontrolle eine Hemmung der Viabilität der THP-1 Makrophagen um 4,9% ($p < 0,01$), 19,1%, 21,0% ($p < 0,01$) und 26,4% ($p < 0,01$) (Abb. 20). 3c zeigte bei 80 μM eine Abnahme der Viabilität der THP-1 Makrophagen um 6,2% im Vergleich zur Positivkontrolle (1) (Abb. 20).

Bei dem Derivat 5a existierte keine Abnahme der Viabilität der THP-1-Makrophagen (Abb. 20). Es zeigte sich bei Derivat 5a in den Konzentrationen 20 μM und 40 μM im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Viabilität der THP-1 Makrophagen um 6,8% und 27,8% (Abb. 20).

Auch die Derivate 4a und 6a erzeugten keine Abnahme der Viabilität der THP-1 Makrophagen im Vergleich Negativkontrolle. Das Derivat 4a zeigte in den Konzentrationen 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante Zunahme der Viabilität der THP-1 Makrophagen um 15,49% ($p < 0,05$), 22,6% ($p < 0,01$) und 17,1% ($p < 0,01$) (Abb. 20).

Beim Derivat 6a wurde in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM , 40 μM und 80 μM im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante Zunahme der Viabilität der THP-1 Makrophagen um 24,3% ($p < 0,01$), 17,1% ($p < 0,05$), 33,2% ($p < 0,01$), 34,9% ($p < 0,01$) beobachtet (Abb. 20).

5.3 Apoptose-Assay



– Ergebnisse –

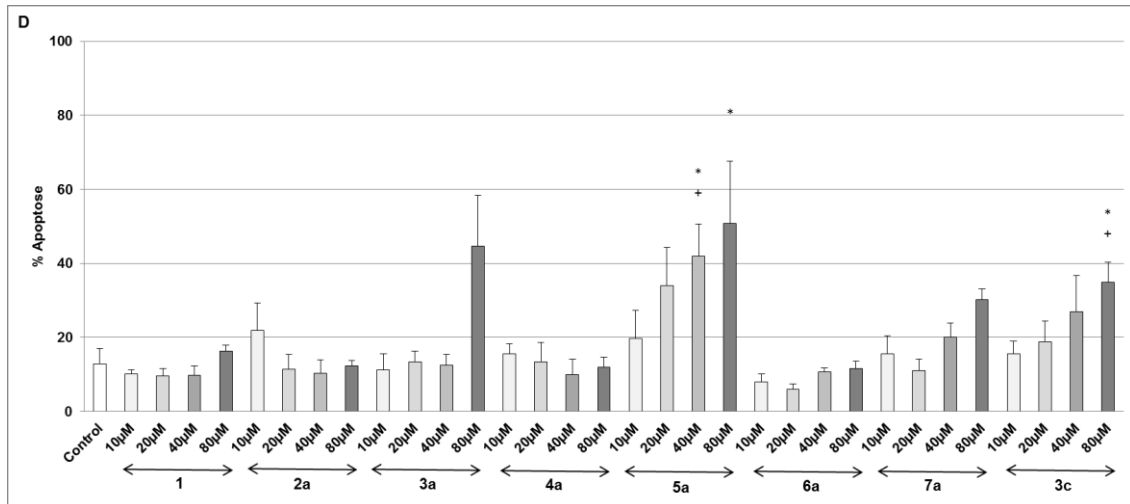


Abbildung 21: Effekte der Behandlung humaner HT-29-Zellen mit 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a und 3c auf die Apoptose Rate nach (A) 1 h, (B) 2 h, (C) 4 h, oder (D) 6 h Inkubation. Die Werte (in % Apoptose) sind angegeben als Mittelwert + SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p < 0,05$, ++: $p < 0,01$, +++: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle) N=3. (Farhat et al. 2014)

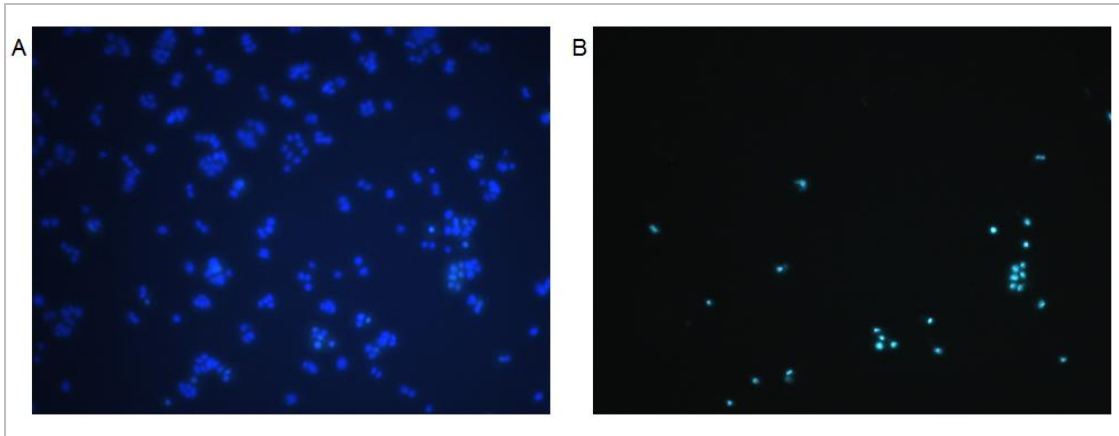


Abbildung 22: HT-29-Zellen nach 6 h Inkubation mit 40 µM 5-FU (1), gefärbt mit Hoechst 33342 (A) und YO-PRO®-1 (B)

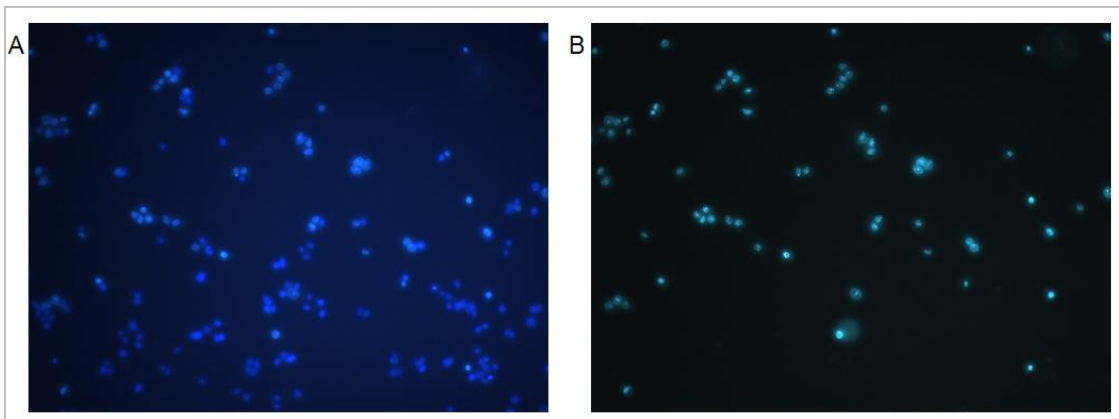


Abbildung 23: HT-29-Zellen nach 6 h Inkubation mit 40 µM Derivat 5a in, gefärbt mit Hoechst 33342 (A) und YO-PRO®-1 (B)

Wir untersuchten die Effekte von 5-FU (1), 5-FUrd (2a) sowie dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a und 3c im Hinblick auf die Apoptose-Rate der humanen Kolonkarzinomzellen HT-29 nach 1h, 2h, 4h und 6h Inkubationszeit.

Die Substanzen 3a, 5a und 3c zeigten nach 1 h Inkubation eine geringfügige (statistisch nicht signifikante) Zunahme der Apoptose-Rate bei 80 µM Konzentration (Abb. 21A).

Nach 2 h Inkubation zeigte nur Substanz 5a bei 80 µM eine signifikant erhöhte Apoptose-Rate um das 3,1-Fache ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle und um das 3-Fache ($p < 0,05$) im Vergleich zu 5-FU (1) (Abb. 21B).

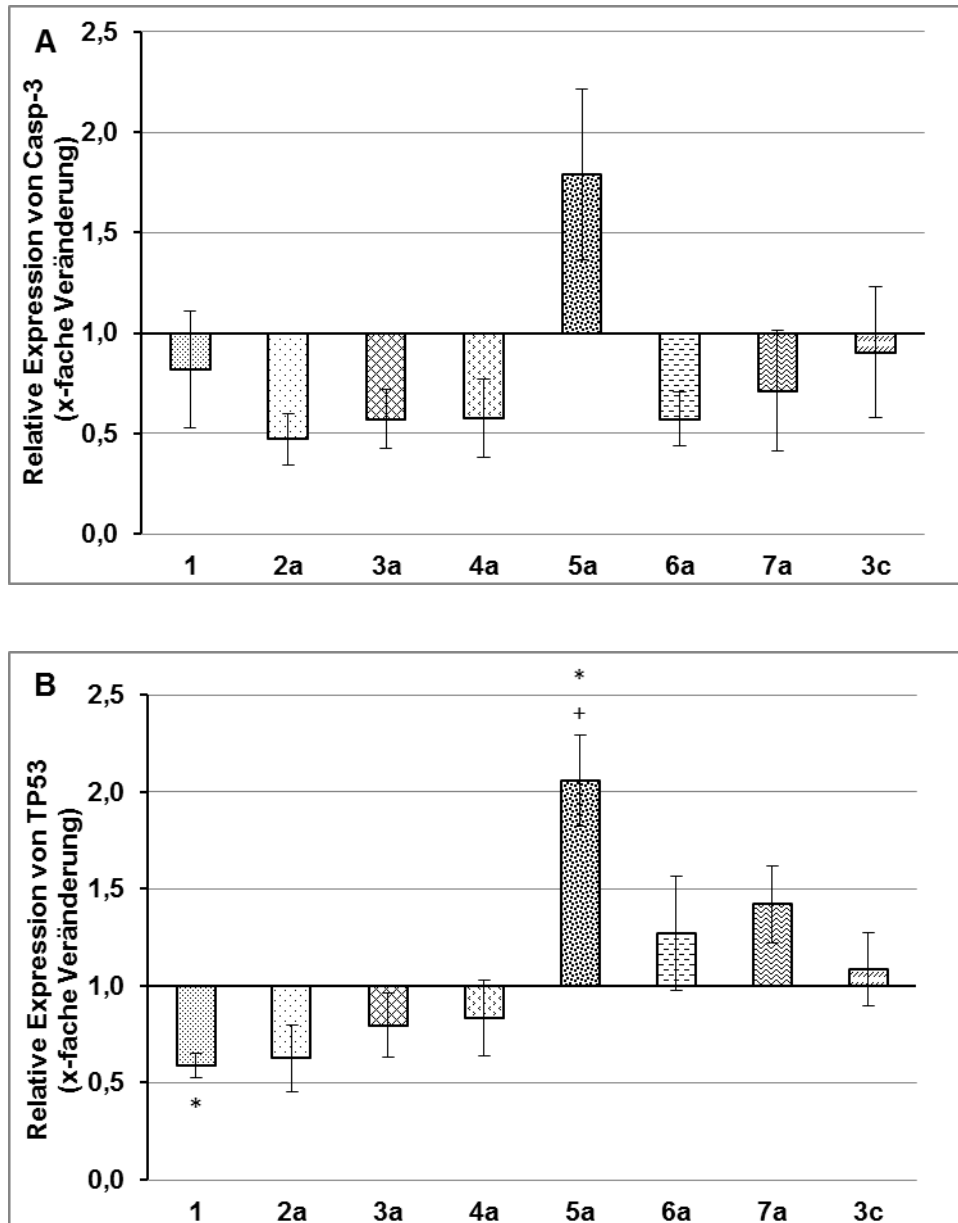
4 h Inkubation der HT-29-Zellen mit 80 µM Derivat 3a führte zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptose-Rate um das 3-Fache ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle und ebenso um das 3-Fache ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle (1) (Abb. 21C).

Bei dem Derivat 5a fanden wir nach 4 h Inkubation der HT-29-Zellen mit 80 μM eine Erhöhung der Apoptose-Rate im Vergleich zur Negativkontrolle um das 3,1-Fache ($p < 0,01$) und um das 3-Fache ($p < 0,01$) im Vergleich zur Positivkontrolle (1) (Abb. 21C). Das Derivat 3c zeigte nach 4 h Inkubation der HT-29-Zellen mit 80 μM Konzentration eine Zunahme der Apoptose-Rate im Vergleich zur Negativkontrolle um das 4-Fache ($p < 0,05$) und um das 4,4-Fache ($p < 0,05$) im Vergleich zur Positivkontrolle (1) (Abb. 21C).

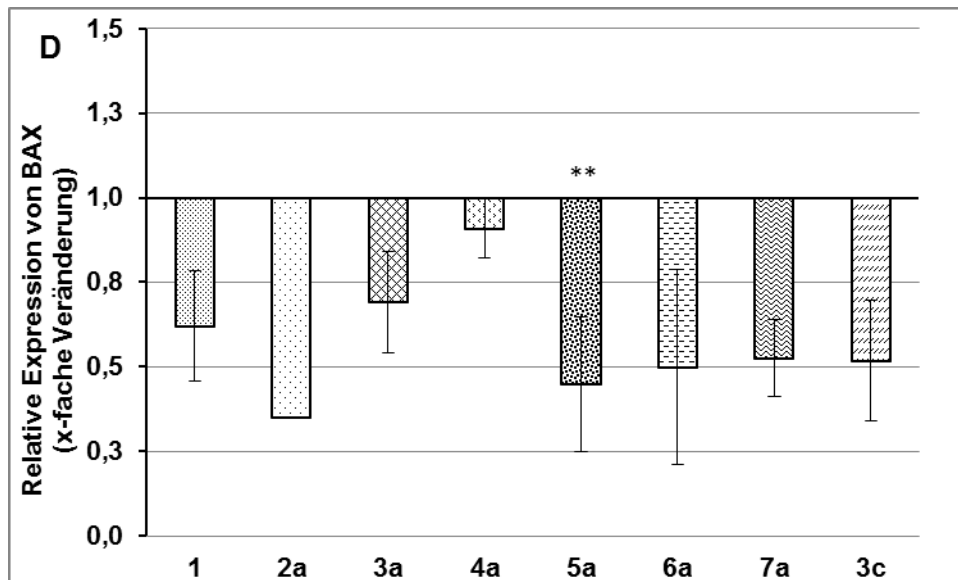
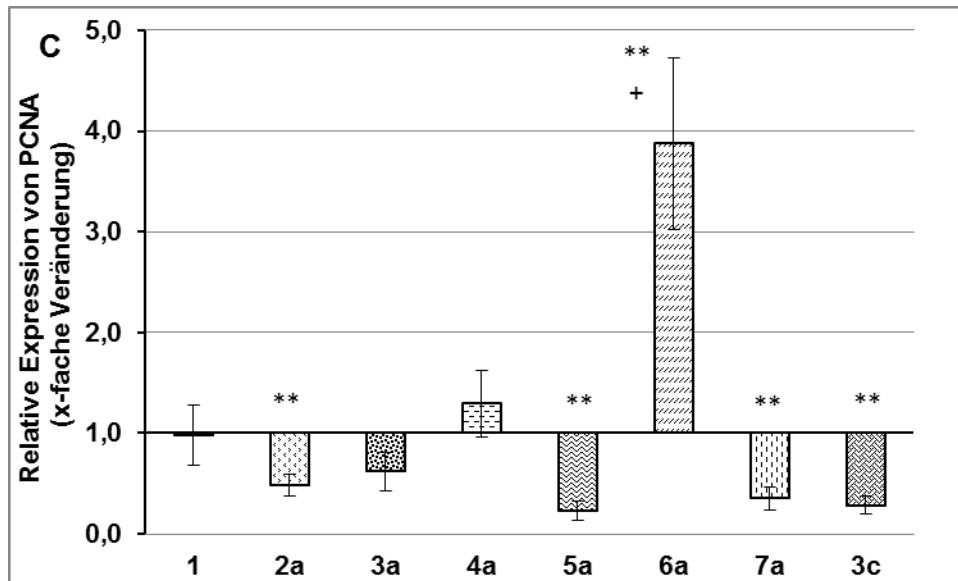
Nach 6 h Inkubation (Abb. 21D) konnte bei Derivat 5a eine signifikante Zunahme der Apoptose-Rate im Vergleich zur Negativkontrolle um das 3,3-Fache ($p < 0,05$) bei 40 μM und um das 4-Fache ($p < 0,05$) bei 80 μM beobachtet werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle (1) erzielte 5a eine signifikante Steigerung der Apoptose-Rate um das 5,3-Fache ($p < 0,05$) in der Konzentration 40 μM .

Nach 6 h Inkubation mit dem Derivat 3c bei 80 μM konnte ein Anstieg der Apoptose-Rate im Vergleich zur Negativkontrolle (um das 2,7-fache, $p < 0,05$) und zur Positivkontrolle(1) (um das 2,2-Fache, $p < 0,05$) beobachtet werden. Abbildung 22 zeigt HT-29-Zellen nach 6h Inkubation mit 40 μM 5-FU (1), gefärbt mit Hoechst 33342 (A) und YO-PRO[®]-1 (B). Es sind in der Färbung mit YO-PRO[®]-1 (B) nur einige wenige apoptotische Zellen zu erkennen. Es gibt keine signifikante Zunahme der Apoptose-Rate. Abbildung 23 dagegen zeigt HT-29-Zellen nach 6 h Inkubation mit 40 μM Derivat 5a, gefärbt mit Hoechst 33342 (A) und YO-PRO[®]-1 (B). Hier ist in der Färbung mit YO-PRO[®]-1 (B) ein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellen um das 5,3-Fache ($p < 0,05$) im Vergleich zu 5-FU (1) zu erkennen (siehe auch Abb. 21D).

5.4 Real-time PCR



– Ergebnisse –



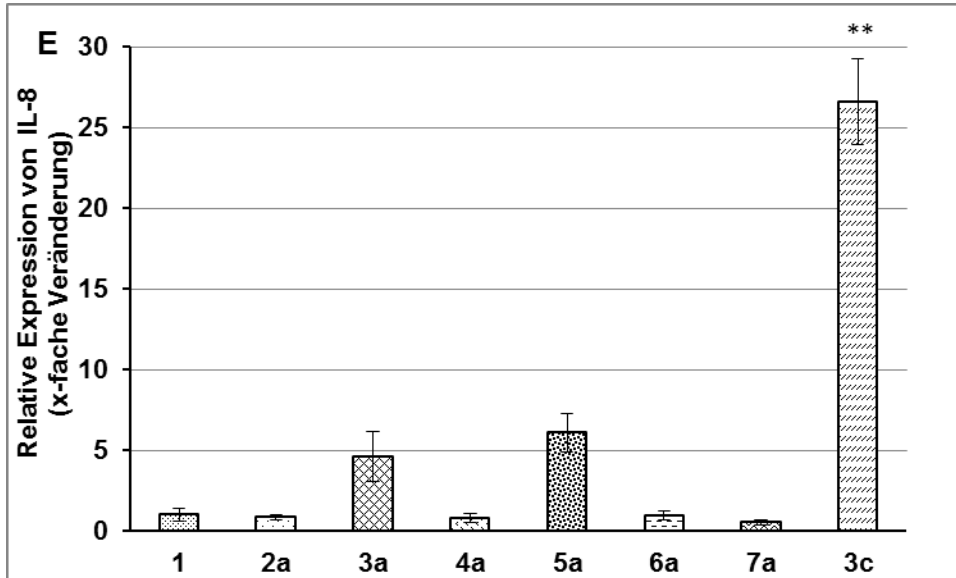


Abbildung 24: Die mRNA Expression (gemessen mittels qRT-PCR) von A) Caspase-3, B) TP53 (p53), C) PCNA, D) BAX (Farhat et al. 2014) und E) IL-8 bestimmt nach 6-h Inkubation der humanen HT-29-Zellen mit 40 μ M 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivaten 3a, 4, 5, 6, 7 und 3c. Die Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Kontrollwerte wurden als 1 gesetzt. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm SEM; N=3. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$ vs. Negativkontrolle; + : $p<0,05$ vs. 5-FU (1).

Nach 6 h Inkubation der humanen HT-29-Zellen mit 40 μ M fanden wir bei Derivat 5a mittels qRT-PCR eine 1,8-fache Zunahme (statistisch nicht signifikant) der Expression des proapoptotischen Caspase-3-Gens im Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen nur in Medium kultiviert) (Abb. 24A). Bei Inkubation der HT-29-Zellen mit den Substanzen 5-FU (1), 5-FUrd (2a), 3a, 4a, 6a, 7a sowie 3c konnte keine vermehrte Expression des Caspase-3-Gens festgestellt werden (Abb. 24A). Des Weiteren konnten wir eine statistisch signifikante ($p<0,05$) Zunahme der Expression des Tumorsuppressorgens p53 um ca. das 2-Fache im Vergleich zur Negativkontrolle und zu 5-FU (~Positivkontrolle) nach Inkubation mit Derivat 5a nachweisen (Abb. 24B). Die Inkubation mit dem Derivat 6a induzierte eine statistisch signifikante Zunahme der Expression des Proliferationsmarkers PCNA (proliferating cell nuclear antigen) im Vergleich zur Negativkontrolle ($p<0,01$). Ebenso konnte bei Derivat 6a eine signifikante Zunahme der PCNA-Expression um das 3,8-Fache ($p<0,05$) im Vergleich zu 5-FU beobachtet werden (Abb. 24C). Bei Derivat 4a konnte eine geringe, statistisch nicht signifikante Zunahme der Expression des PCNA-Gens um das 1,3-Fache beobachtet werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte bei den Substanzen 5-FUrd (2a) (2-

fach), 5a (4,4-fach), 7a (2,8-fach) und 3c (3,5-fach) eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme der Expression des PCNA-Gens nachgewiesen werden (Abb. 24C).

Bei der Inkubation der HT-29-Zellen mit den Substanzen 5-FU (1), 5-FUrd (2a) 3a, 4a, 6a, 7a und 3c konnten wir eine Abnahme der Expression des BAX-Gens feststellen (Abb. 24D). Nur bei Derivat 5a wurde eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Reduktion der Expression des BAX-Gens um das 2,2-Fache, im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet.

Bei den Derivaten 3a (5-fach), 5a (6-fach) und 3c (26,6-fach; $p < 0,01$) konnte mittels qRT-PCR eine Zunahme der Expression des IL-8-Gens im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden (Abb. 24E).

6 Diskussion

Die Krebstherapie ist von der Effizienz des verwendeten Medikamentes abhängig. Die Effizienz ist durch die Verfügbarkeit des Medikamentes im Tumorgebiet begrenzt (Mader et al. 2011). Ein Medikament ist umso effektiver, je fähiger es ist aus der peripheren Durchblutung in die maligne Läsion zu gelangen (Mader et al. 2011). Durch diese stark eingeschränkte Verfügbarkeit erreicht nur ein kleiner Prozentteil der eingesetzten Dosis des Medikamentes das Tumorgebiet. Der Rest verursacht unerwünschte Nebenwirkungen (Mader et al. 2011).

Daher ist die Entwicklung und Herstellung von Substanzen, die die Zellvermehrung hemmen und den Tumor in therapeutischen Dosen erreichen, ohne unerwünschte Nebenwirkungen hervorzurufen, zurzeit von großem Interesse. Um Medikamente zu entwickeln, die an die DNA binden und zu einer Funktionsstörung der DNA führen, wurden im Lauf der Zeit mehrere Strategien und Vorgehensweisen verwendet. In diesem Zusammenhang stellen Fluoropyrimidine Antimetabolite dar, die weit verbreitet in der Therapie solider Tumore, einschließlich Magen-, Kolon- und Mamma-Karzinom, sowie in der Behandlung des RCC und HCC eingesetzt werden (Bodner-Adler et al. 2007, Carrato 2008, Khosravi Shahi et al. 2007, Kish et al. 1994, Zhao et al. 2013).

Es ist bekannt, dass 5-FU (1) die Bildung von Thymidin, welches für die DNA-Synthese benötigt wird, herabsetzt (Sommer & Santi 1974). Ein anderer Mechanismus der Zytotoxizität von 5-FU ist dessen Integration in die RNA und die funktionelle Störung der RNA (Ishii & Marumo 2004). 5-FU wird häufig intravenös verabreicht. Es erfolgt allerdings eine schnelle Metabolisierung von über 80% des Medikamentes in der Leber (Diasio & Harris 1989).

Die Aufnahme kationischer, zelldurchdringender Medikamente ist von lipophilen Interaktionen an der Zelloberfläche abhängig. Dies erfolgt vor allem durch direkten Eintritt des Medikaments in die Zelle durch Diffusion oder Endozytose, entsprechend Lipinskis Regel (Lipinski et al. 2001). Die wichtigsten molekularen Eigenschaften für die Pharmakokinetik eines Medikamentes im menschlichen Körper sind: „absorption, distribution, metabolism, and excretion“ (ADME) (Lipinski et al. 2001).

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt beim Einsatz von 5-FU und verwandten Substanzen ist die Entwicklung von Resistenzen der Tumore gegen die Medikamente, die auch den Medikamententransport mit betreffen können (Wang et al. 2014).

In diesem Zusammenhang müssen verschiedene Modalitäten der Medikamentengabe oder Veränderungen der molekularen Struktur bedacht werden, um die therapeutische Effizienz von 5-FU (1) zu verbessern. Um zu testen ob die gewünschte Wirkung durch diese Veränderungen erreicht wird, müssen Tests an verschiedenen Krebszelllinien durchgeführt werden.

In Übereinstimmung mit diesen therapeutischen Strategien haben Prof. Dr. Rosemeyer und Frau Dr. Malecki verschiedene Derivate von 5-FUrd (2a) hergestellt (Köstler et al. 2013, Malecki et al. 2013a, Malecki et al. 2013b, Malecki et al. 2014, Malecki & Rosemeyer 2010, Rosemeyer et al. 2012, Rosemeyer & Malecki 2012, Werz et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die zytotoxischen Effekte dieser Derivate auf humane HT-29-Kolonkarzinomzellen, murine renale Adenokarzinomzellen (RENCA) und auf humane Hepatoblastomzellen (HepG2) untersucht.

Des Weiteren wurden potentielle molekulare Mechanismen, durch die 5-FU und dessen Derivate zytotoxische Effekte bei den Karzinomzelllinien verursachen, untersucht.

Wir konnten zeigen, dass die ATTO 425[®]-konjugierten 5-Fluorouridinderivate in die HT-29-Zellen aufgenommen wurden. Diese ließen allerdings alle eine zytoplasmatische Lokalisation unter Aussparung des Nukleus erkennen. Nur 5-FUrd (2c) wies eine granulierte Verteilung im Zytoplasma auf. Diese Beobachtungen passen zu den Ergebnissen des Viabilität-Assays mit den ATTO 425[®]-konjugierten Derivaten 2c und 3b-7b: Die Derivate werden zwar in die Zellen aufgenommen, aber sie erreichen ihren intrazellulären Zielort, den Zellkern, nicht. Das mag den Verlust der Zytotoxizität der Derivate erklären. Nach Konjugation mit ATTO 425[®] verloren die Derivate 3a, 5a und 7a ihre Wirkung sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h Inkubationszeit. Eine denkbare Interpretation dieses Ergebnisses kann die Blockierung der 5'-Position des Nukleotids durch die kovalente Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs (ATTO 425[®]) sein. Diese könnte eine Phosphorylierung der entsprechenden Verbindung zu einem 5'-Triphosphat verhindern.

Das mit ATTO 425[®]-konjugierte 5-FUrd (2c) allerdings behielt seine zytostatische Wirkung trotz kovalenter Bindung von drei ATTO 425[®]-Molekülen. Ursache hierfür kann ein Rest an freiem, nicht mit ATTO 425[®]-konjugiertem 5-FUrd in der Probe sein, welches die zytostatischen Effekte an den HT-29-Zellen bewirkt.

Wie schon eingangs erwähnt, ist das KKR weltweit der am dritthäufigsten diagnostizierte Tumor (Ferlay et al. 2015). In der Behandlung des KKR wird 5-FU routinemäßig intravenös eingesetzt in den Chemotherapie Regimen FOLFOX und

FOLFIRI (Wyatt & Wilson 2009). Klinische Probleme entstehen unter anderem durch zirkulierende Tumorzellen im Körper, die zu einer Metastasierung in die Leber und anderen Organen führen, aber auch durch die bestehenden Resistenzen der Tumore gegen 5-FU (Nita et al. 1998).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Derivate in die Zellen eintraten. Sie zeigen auch, dass die Derivate 3a, 5a und das uridine Nukleolipid 3c nach 24 h Inkubation in HT-29-Zellen die höchste *in vitro*-Aktivität, d.h. eine signifikante Reduktion der Viabilität, aufwiesen. Diese Ergebnisse bestätigten sich nach 48 h und nach 72 h Inkubationszeit. Das Derivat 7a erzielte erst nach 48 h und 72 h eine signifikante Hemmung des Überlebens der HT-29-Zellen und war im Vergleich zu 3a, 5a und 3c weniger effektiv. Ähnliche Effekte konnten auch bei der Behandlung anderer Krebszelllinien z.B. RENCA oder HepG2 beobachtet werden.

Das Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma, RCC) ist eines der häufigsten inkurablen malignen Tumoren mit einer schlechte Prognose und hoher Resistenzrate zu Radio- und Chemotherapie (Ishii & Marumo 2004). 5-FU (1) und verwandte Präparate erzielen nur eine geringe Ansprechrates von ca. 5% (Kish et al. 1994). In der Therapie des RCC wird regelmäßig eine Kombinationstherapie aus 5-FU (1) und Interferon (IFN) angewendet, die im murinen RCC synergistische zytotoxische Effekte aufweist (Ishii & Marumo 2004). Eine Veränderung der molekularen Struktur wäre eine effektive Strategie, um die Wirkung des Medikamentes zu verbessern. Wir haben auch in der Testung der Derivate an den murinen RENCA-Zellen zwei Derivate 3a und 5a gefunden, die effektiver waren, als 5-FU (1). Bei den Derivaten 3c und 7a konnten ähnliche Effekte auf die Viabilität der RENCA-Zellen, wie bei den Substanzen 1 und 2a, festgestellt werden.

Die Prognose der Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom (HCC) ist schlecht, da bei der Mehrheit der Patienten die Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt bereits in einem fortgeschrittenen Stadium ist (Wang et al. 2009). Auch bei der Behandlung des fortgeschrittenen HCC wird 5-FU häufig in der Chemotherapie eingesetzt, entweder alleine oder als Kombinations-Chemotherapie (Zeng et al. 2014). Die Ansprechraten sind niedrig und die Ansprechdauer ist typischerweise sehr kurz (Zhu 2006). Daher ist es auch für die Therapie des HCC von hoher Bedeutung neue Chemotherapeutika mit hoher therapeutischer Effizienz zu finden (Zeng et al. 2014).

Bei der Untersuchung der Derivate bezüglich der Viabilität der HepG2-Zellen konnten wir die Derivate 3a und 3c identifizieren, die deutlich wirksamer waren als 5-FU. Auch

die Derivat 5a und 7a zeigten eine deutlich höhere Reduktion der lebenden HepG2-Zellen.

Die ungebundenen Nukleolipide (d.h. die ohne ATTO 425[®]-Konjugation) 3a-7a können grundsätzlich phosphoryliert und enzymatisch an den wachsenden Nukleinsäurestrang angefügt werden. Alle Nukleolipide, 3a-7a, haben terminierende Eigenschaften in Bezug auf das Wachstum des Nukleinsäurestrangs. Mit der Bindung eines 2',3'-O-blockierten Nukleotides wird die enzymatische Verlängerung des Nukleinsäurestrangs unterbunden und die Apoptose der Zelle eingeleitet.

Für die Zytotoxizität von 5-FU (1) scheinen, wie schon erwähnt, mehrere biochemische Mechanismen verantwortlich zu sein: Zum einen spielt die Hemmung der Thymidylat-Synthase und die daraus folgende Hemmung der Konversion zu 2'-Desoxy-5-Fluoridine-5'-Monophosphat (Sommer & Santi 1974) für die Wirkung von 5-FU eine entscheidende Rolle. Aber auch die Umwandlung von 5-FU zu 5-Fluorouridine-5'-Triphosphat und dessen Einbau in die RNA sowie die Aufnahme in die DNA und die dadurch bedingte eine Schädigung der Integrität der DNA (Soni & Srikrishnan 2004) sind maßgeblich an der Wirkung beteiligt.

Es ist jedoch denkbar, dass die aktiven Metabolite 3a-7a nicht über diesen klassischen biochemischen Mechanismus die Apoptose der Tumorzellen hervorrufen, sondern dass der beschriebene Abbruch der Verlängerung des Nukleinsäurestrangs durch die 2',3'-O-Blockade für die Apoptose der Zellen verantwortlich ist. Dieser terminierende Mechanismus ist analog zu der beschriebenen Wirkung von 3'-Azido-2',3'-Dideoxythymidine (AZT), einem antiretroviralem Medikament (Furman et al. 1986).

Damit ein verabreichtes Medikament den Zellkern erreicht, sind zwei wesentliche Hindernisse zu überwinden: 1) die zelluläre Aufnahme durch direkte Translokation in einem energetisch unabhängigen Prozess oder durch Endozytose, bei der die Freisetzung aus den Endosomen wesentlich für den Übertritt in zahlreiche zelluläre Kompartimente ist und 2) der Durchtritt durch die Zellkernmembran in den Zellkern (Noor et al. 2009). Die zelluläre Aufnahme von kationischen zellpenetrierenden Proteinen (cell-penetrating peptides; CPPs) hängt von den lipophilen Interaktionen an der Zelloberfläche ab, die den direkten Eintritt durch Diffusion oder Endozytose ermöglichen (Noor et al. 2009).

Die aktiven 5-Fluorouridinederivate 3a und 5a und 7a besitzen mehr lipophile Gruppen, als die Derivate 4a und 6a und führen zu einer verbesserten Diffusion durch die Zellmembran. Die Derivate 4a und 6a wiesen keine zytotoxischen Effekte bei den

getesteten Krebszelllinien (HT-29, RENCA, HepG2) oder bei differenzierten humanen THP-1-Zellen auf. Diese Daten weisen darauf hin, dass die zytotoxischen Effekte von 3a und 5a und 7a spezifisch für die Substanzen sind, unabhängig von der Krebszelllinie. Zusätzlich liefert die fehlende Zytotoxizität der Derivate 4a und 6a in allen getesteten Zelllinien einen Beweis dafür, dass die Menge der lipophilen Reste eine entscheidende Rolle in ihrer Bioaktivität spielt.

Besonders interessant ist, dass das Derivat 5a seine zytotoxische Wirkung bei der Behandlung der THP-1-Makrophagen verliert. Diese sind humane, differenzierte Zellen, die als Beispiel für gesunde Körperzellen angesehen werden können. Die Reduktion der Zytotoxizität des Derivates im Vergleich zu 5-FU (1) könnte auf geringere Nebenwirkungen hoffen lassen. Die anderen Derivate, die eine effektive Hemmung des Überlebens bei den getesteten Krebszelllinien aufwiesen (3a, 7a und 3c), erwiesen sich bei der Testung an den THP-1 leider als zytotoxischer als 5-FU, sodass eine erhöhte Nebenwirkungsrate zu erwarten sein könnte.

Die Substanzen 5-FU (1) und 5-FUrd (2a) zeigten eine Inhibitionskurve, deren Verlauf charakteristisch ist für einen zytostatischen Effekt (Eda et al. 1993, Weinreich et al. 2012, Weinreich et al. 2011). Betrachtet man den Kurvenverlauf der Derivate 3a und 3c in der Behandlung der Krebszelllinien, so veränderte sich der zytostatische Effekt zu einem zytotoxischen Effekt. 3c wies trotz des fehlenden Fluoratoms in der Molekülstruktur diese Hemmungskurve auf. In der Behandlung der RENCA-Zellen allerdings verlor 3c diesen Effekt und verhielt sich ähnlich wie die Derivate 1 und 2a. Denkbar ist, dass das Derivat 3c durch den Verlust des Fluoratoms in der molekularen Struktur entweder einen anderen Wirkmechanismus in der Zelle aufweist oder ein anderes Ziel in der Zelle hat. Der Wirkmechanismus kann allerdings derzeit nicht abschließend geklärt werden.

Bei der Untersuchung der molekularen Mechanismen und zellulären Signalwege der Chemotherapeutika wurden eine Reihe von Genen gefunden, die die Antwort der Tumorzellen auf 5-FU modulieren, unter anderem das Tumorsuppressorgen p53.

P53 als Tumorsuppressor ist wahrscheinlich, aus evolutionsbiologischer Sicht, ein relativ neuer Mechanismus von Organismen, um die Ansammlung von Mutationen zu verhindern (Amaral et al. 2010). P53 vermittelt typischerweise den mitochondrialen, intrinsischen Weg der Apoptose (Amaral et al. 2010). Bax ist mit dem p53-Pfad verbunden und stellt ein direktes Ziel von p53 dar (Miyashita & Reed 1995). Dieses proapoptotische Protein aus der Bcl-2-Familie spielt eine wichtige Rolle bei der

Einleitung der Apoptose (Kurokawa & Kornbluth 2009). An den Mitochondrien induziert p53 eine Bax oder Bak Oligomerisierung, antagonisiert die antiapoptotischen Effekte von Bcl-2 und Bcl-X_L und formt einen Komplex mit Cyclophilin D in der inneren Mitochondrienmembran (Wolff et al. 2008). Dies führt zur Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Apoptosefaktoren (Amaral et al. 2010). Der genaue molekulare Mechanismus, über den die Bcl-2 Proteine zu einer Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran führen, wird kontrovers diskutiert (Chipuk & Green 2008). Der Apoptosefaktor Cytochrom C wird frei und führt zur Oligomerisierung des Adaptorproteins Apaf-1, welches Caspase 9 aktiviert (Kurokawa & Kornbluth 2009). Die Caspase 9 aktiviert die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 (Kurokawa & Kornbluth 2009), die durch Proteolyse überlebenswichtiger Proteine zum Tod der Zelle führen (Fischer et al. 2003). Wie wichtig p53 für die Aufrechterhaltung der Genomstabilität ist, ist daran zu erkennen, dass die Hälfte aller Tumore ein mutiertes p53-Gen tragen (Amaral et al. 2010). In einem *in vitro*-Versuch konnte gezeigt werden, dass das wtp53-Protein, das zu Zellen hinzugefügt wurde, eine Bax und Bak Oligomerisierung induziert und die Apoptose bedingt. Bei einer aus Tumorzellen abgeleiteten p53-Mutation wurde keine Apoptose Induktion beobachtet (Wolff et al. 2008).

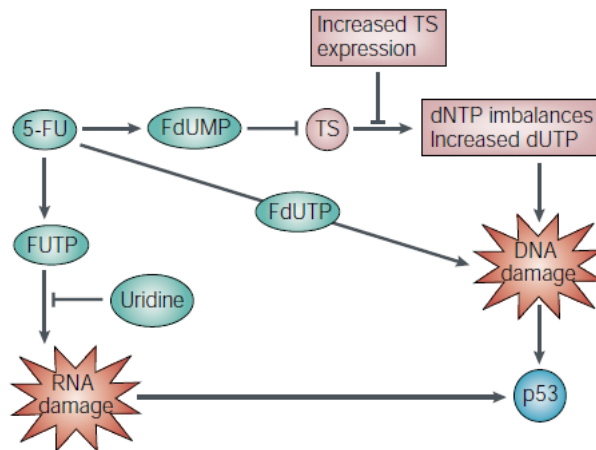


Abbildung 25: Aktivierung von p53 durch 5-FU (Longley et al. 2003)

Nach der Hypothese von Longley et al. (2003) führen die Wirkmechanismen von 5-FU (der Einbau von FdUTP in die RNA, der Einbau von FdUTP in die DNA und die TS-Hemmung durch FdUMP sowie der daraus resultierende DNA-Schaden) zur Aktivierung von p53 (Abb. 26) und daraus resultierend zur Apoptose der Zellen (Longley et al. 2003). Studien haben gezeigt, dass der Verlust der p53-Funktion die

zelluläre Sensitivität auf 5-FU reduziert (Bunz et al. 1999, Longley et al. 2002). Einige Autoren konnten zeigen, dass der Verlust der p53-Funktion mit einer Überexpression des p53-Gens einhergeht (Ahn et al. 1998, Liang et al. 2002).

Die Ergebnisse unserer qRT-PCR ergaben eine Expressionshemmung von p53 durch die Behandlung mit 5-FU und zeigten statistisch signifikante, zytostatische Effekte auf die HT-29-Zellen.

Vor ca. zehn Jahren zeigte eine Studie, dass 5-FU die Expression von p53 in HT-29-Zellen hemmt (Zhang et al. 2003).

Dieses Ergebnis konnten wir im Rahmen der qRT-PCR reproduzieren.

Das Derivat 5a induziert interessanterweise die Expression der mRNA des Tumorsuppressor p53. 5a triggert möglicherweise die Induktion der Apoptose über die Aktivierung von Caspase-3 mit einer gleichzeitigen Hemmung der Proliferation (PCNA). Es ist denkbar, dass 5a, anders als 5-FU (1), über diesen Weg seine zytotoxischen Effekte entfaltet.

Wir haben in den Ergebnissen unserer qRT-PCR keine Aktivierung der BAX-Expression, verbunden mit einem proapoptotischen Effekt, feststellen können, weder im Zusammenhang mit der p53-Expression noch mit der Caspase-3-Expression. Es konnte mittels Immundepletion gezeigt werden, dass für die Cytochrom C abhängige Aktivität von p53 zytoplasmatisches Bax verwendet wird (Schuler et al. 2000).

Die Induktion der Apoptose durch das Derivat 5a scheint ebenfalls unabhängig von der Induktion der BAX-Expression zu sein.

Zusätzlich zeigte das Derivat 5a eine konzentrationsabhängige Induktion des Zelltodes, wie wir im Apoptose-Assay darstellen konnten. Ebenso verhielten sich die Derivate 3a und 3c, nach 4h und 6h Inkubationszeit. 3a zeigte in der qRT-PCR eine nicht signifikante Hemmung der Expression des p53-Gens und des Caspase-3-Gens. Das Derivat 3c zeigte in der qRT-PCR keine Effekte auf die Expression des p53-Gens oder des Caspase-3-Gens.

Wir haben nach der Behandlung mit dem Derivat 5a eine Aktivierung von Caspase-3 festgestellt. Caspase-3 ist ein Schlüsselenzym der Apoptose, das essentiell ist für die medikamenteninduzierte Apoptose. Diese Aktivierung konnten wir nach einer Behandlung mit den Substanzen 5-FU (1) oder 5-FUrd (2a) oder mit den anderen Derivaten nicht feststellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Derivat 5a in den HT-29-Zellen die Apoptose über den mitochondrialen Pfad induziert, abhängig von der Caspase-3 Aktivierung und unabhängig vom p53-Status.

In der qRT-PCR testeten wir auch den Einfluss der Derivate auf die IL-8-Expression. Interleukin 8 (IL-8) zählt zu den Chemokinen. Diese sind spezialisierte Zytokine, die von einer Vielzahl normaler sowie neoplastischer humaner Zelltypen produziert und sekretiert werden und durch ihre Fähigkeit die Migration von Leukozyten zu induzieren definiert sind (Brat et al. 2005). Neben seiner potenten proinflammatorischen Eigenschaften (Brat et al. 2005) ist IL-8 über verschiedene Mechanismen am Tumorwachstum beteiligt, z.B. durch seine Funktion als potentiell mitogener und angiogener Faktor (Xie 2001). Im Tumor wird die IL-8-Expression über zahlreiche Faktoren reguliert, wie z.B. Hypoxie, Azidose, Stickstoffmonoxid und die Zelldichte (Xie 2001). Da IL-8 eine direkte Rolle bei der Angiogenese spielt und es die Apoptose hemmt sowie die Expression antiapoptotischer Gene fördert (Li et al. 2003), kann die Expression von IL-8 ein mögliches Ziel in der Tumorthherapie darstellen, um das Tumorwachstum und die Metastasierung zu kontrollieren (Xie 2001).

Unsere qRT-PCR Ergebnisse zeigen keine Hemmung der IL-8-Expression bei der Behandlung mit den 5-Fluorouridinederivaten. Es zeigte sich im Gegenteil eine erhöhte IL-8-Expression bei den Derivaten 3a, 5a und 3c. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass 5-FU und dessen Derivate über verschiedene Wirkmechanismen Apoptose induzieren.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass das Derivat 5a in Kolonkarzinomzellen (HT-29) Caspase-3 vermittelt Apoptose induziert. Dies geschieht scheinbar durch einen p53-unabhängigen Mechanismus. Außerdem war 5a gegen drei Krebszelllinien wirksam (HT-29, RENCA, HepG2), zeigte aber keine Zytotoxizität gegen differenzierte THP-1-Makrophagen.

Diese Ergebnisse liefern nützliche grundlegende Informationen über die Anwendung von lipophilen Derivaten, um zytotoxische Effekte und die Behandlung von Patienten mit verschiedenen Tumortypen zu verbessern.

Es sind aber noch weitere tierexperimentelle und prospektive klinische Studien notwendig, um dieses neue therapeutische Potential abschließend beurteilen zu können.

7 Zusammenfassung

2012 standen maligne Erkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik in Deutschland (Becker & Holzmeier 2012). Einen wichtigen Baustein in der Therapie der malignen Erkrankungen stellt die Chemotherapie dar. Trotz großer Fortschritte in den vergangenen Jahren konnte nur eine geringe Verbesserung des Überlebens der Patienten erzielt werden (Bourret et al. 1979, Krook et al. 1991).

Das Uracil-Analogon 5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Antimetabolit, der weit verbreitet in der Chemotherapie maligner Tumoren Anwendung findet (Bodner-Adler et al. 2007, Carrato 2008, Khosravi Shahi et al. 2007, Kish et al. 1994, Zhao et al. 2013). Eines der größten Handicaps von Chemotherapeutika, wie 5-FU, ist die insuffiziente Penetration der Zellmembran, die durch eine hohe Hydrophilie bedingt ist (Malecki et al. 2013a). Daher haben Prof. Dr. Rosemeyer und Frau Dr. Malecki im Rahmen eines Kooperationsprojekts (Prof. Rosemeyer, Osnabrück/Prof. Kinscherf, Marburg) verschiedene Derivate von 5-Fluorouridine (5-FUrd, 2a) entwickelt, welche lipophile Reste in N(3)- und/oder in 2'3'-O-Position tragen (3a-7a, 3c, 2c, 3b-7b), mit dem Ziel durch erhöhte Lipophilie der Derivate eine verbesserte Penetration und eine geringere Rate an Nebenwirkungen zu erreichen (Köstler et al. 2013, Malecki et al. 2013a, Malecki et al. 2013b, Malecki et al. 2014, Malecki & Rosemeyer 2010, Rosemeyer et al. 2012, Rosemeyer & Malecki 2012, Werz et al. 2013). Zusätzlich wurde zum Vergleich das 2'3'-O-Nonadecylidene Derivat von Uridin, 3c, hergestellt (Köstler et al. 2013).

In dieser Dissertation erfolgte die *in vitro*-Testung des Drug Delivery Konzeptes der „Lipid-Nucleosid- und Polysaccharid-Konjugate von 5-FU (2a, 3a-7a, 3c, 2c, 3b-7b)“ an den Krebszelllinien HT-29 (humanes Kolonkarzinom), HepG2 (humanes hepatozelluläres Karzinom), sowie RENCA (murine Nierenzellkarzinom) und an Zellen des Immunsystems, d.h. differenzierten, humanen Makrophagen (THP-1).

Um die Frage zu klären, ob die Substanzen die Zellmembran passieren können, und in welchem Zellkompartiment sie danach lokalisiert sind, wurden HT-29-Zellen mit ATTO 245®-konjugierten Test-Substanzen (2c, 3b-7b) für 24 h inkubiert. Alle Derivate passierten die Zellmembran und akkumulierten im Zytoplasma, unter Aussparung des Zellkerns. Nur das Derivat 2c zeigte eine granulierte Verteilung im Zytoplasma.

Ein Schwerpunkt dieser Dissertation war es, den Einfluss der Aufnahme der Testsubstanzen (3a-7a, 3c) auf die Proliferation und Apoptose der Zellen und die

zytostatische/zytotoxische Aktivität der Derivate im Vergleich zu 5-FU (1) und 5-FUrd (2a) zu untersuchen.

Nach 24 h, 48 h bzw. 72 h Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 mit den Derivaten 1 (5-FU) (14-23%, 35-46%, bzw. 30-58%) und 2a (5-FUrd) (33-45%, 60-67%, bzw. 58-67%) konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Reduktion der Viabilität der Zellen beobachtet werden. Nach 24 h Inkubation der HT-29-Zellen zeigten in den Konzentrationen 40 µM und 80 µM die Derivate 3a (77% und 95%), 5a (30% und 86%) und 3c (89% und 96%) eine signifikante Abnahme der Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese drei Derivate zeigten nach 24 h Inkubation in den Konzentrationen 40 µM und 80 µM ebenfalls im Vergleich zur Positivkontrolle (1) eine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen (61-81%, 73% bzw. 80-82%). Nach 48 h Inkubation der HT-29-Zellen mit den Derivaten konnte bei vier Derivaten in den Konzentrationen 40 µM und 80 µM eine signifikante Abnahme der Viabilität im Vergleich zu 5-FU (~Positivkontrolle) beobachtet werden: 3a (9-54%), 5a (5-48%), 7a (2-30%) und 3c (53-63%). Die Derivate 4a und 6a zeigten keinen Effekt auf die Viabilität der HT-29-Zellen.

Die Derivate 3a, 5a, 7a und 3c zeigten auch bei anderen Krebszelllinien (RENCA und HepG2) eine signifikante Abnahme der Viabilität: Nach 48 h Inkubation der RENCA-Zelllinie mit den Derivaten, zeigten die Derivate 3a (51-57%) und 5a (56%) eine signifikante Abnahme der Viabilität im Vergleich zu 5-FU. Die Derivate 3c (38-49%) und 7a (25-44%) wiesen bei RENCA-Zellen ähnliche zytostatische Effekte auf, wie die Substanzen 1 (29-48%) und 2a (41-46%). Nach 48 h Inkubation der HepG2-Zelllinie mit den Derivaten konnte bei den Derivaten 3a (72-75%), 5a (53%), 7a (43%) und 3c (22-74%) eine signifikante Abnahme der Viabilität im Vergleich zu 5-FU beobachtet werden.

Von besonderem Interesse war das Ergebnis der Testung der Derivate an differenzierten THP-1-Makrophagen, um zwischen zytotoxischen Effekten und Nebenwirkungen unterscheiden zu können. Das Derivat 5a zeigte nach 48 h Inkubation eine signifikant um 6-27% erhöhte Zunahme der Viabilität im Vergleich zu 5-FU (~Positivkontrolle).

Die mit ATTO 425[®]-konjugierten 5-Fluorouridinderivate 3b, 4b, 5b, 6b und 7b wurden bzgl. ihrer Effekte auf die Viabilität der HT-29-Kolonkarzinomzellen getestet, nach 24 h und nach 48 h Inkubationszeit. Die mit ATTO 425[®]-konjugierten 5-FUrd Derivate zeigten in allen getesteten Konzentrationen (10-80 µM) im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede bzgl. Viabilität der Zellen. Nur das mit ATTO 425[®]-konjugierte 5-

FUrd (2c) zeigte in den Konzentrationen 10-80 μM im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität der HT-29-Zellen um 31-52% bzw. 41-57%.

Zusätzlich testeten wir den Einfluss der Derivate auf die Induktion der Apoptose und Proliferation im Vergleich zu 5-FU (1) und 5-FUrd (2a) bei HT-29-Zellen nach 1 h, 2 h, 4 h und 6 h Inkubationszeit. Das Derivat 5a zeigte signifikante Zunahmen der Apoptose bei 80 μM nach 2 h Inkubationszeit (um das 3,1-Fache), nach 4 h (um das 3-Fache) bzw. 6 h (um das 4-Fache). Nach 6 h Inkubation konnte bei 5a auch bei 40 μM eine signifikante Zunahme der Apoptose um das 3,3-Fache beobachtet werden.

Des Weiteren wurde die Gensignatur (zur Testung der Signaltransduktion) der HT-29-Zellen nach Behandlung mit diesen Substanzen untersucht. In der Real-time PCR (qRT-PCR) zeigte das Derivat 5a bei 40 μM eine signifikante Zunahme der Expression des Tumorsuppressorgens p53 um das 2-Fache im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle (5-FU), sowie eine 1,8-fache Zunahme der Expression des proapoptotischen Caspase 3 Gens.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei mehreren Krebszelllinien einige Derivate von 5-FUrd (2a) effektiver in ihrer Zytotoxizität sind, als 5-FU (1) oder 5-FUrd (2a). Besonders das Derivat 5a ist von großem Interesse, da es trotz der hohen zytotoxischen Aktivität bei Krebszelllinien, keine zytotoxischen Effekte bei differenzierten Makrophagen (~Immunzellen) zeigt. Das Derivat 5a könnte somit ein neuartiges, zytotoxisches, multipotentes Chemotherapeutikum darstellen.

Zur abschließenden Beurteilung des pharmakologischen/therapeutischen Potentials sind allerdings weitere Untersuchungen, z. B. an Mikrotumoren/-sphären, sowie tierexperimentelle und prospektive klinische Studien notwendig.

8 Summary

In 2012 malignant diseases were ranked at second position in German mortality statistics (Becker & Holzmeier 2012). Chemotherapy is one of the most important components in the therapy of malignant tumors. However, despite great advances in recent years only a marginal improvement of the survival of the patients could be achieved (Bourret et al. 1979, Krook et al. 1991). 5-Fluorouracil (5-FU) - an uracil analogue - is an antimetabolite, which is widely used in the therapy of malignant illnesses (Bodner-Adler et al. 2007, Carrato 2008, Khosravi Shahi et al. 2007, Kish et al. 1994, Zhao et al. 2013). One of the major handicaps of many chemotherapeutics-like 5-FU- is the insufficient penetration through cell membranes due to high hydrophobicity (Malecki et al. 2013a). Therefore, Prof. Dr. Rosemeyer und Dr. Malecki developed in a cooperation project (Prof. Rosemeyer, Osnabrück/Prof. Kinscherf, Marburg) several derivatives of 5-FUrd (2a) carrying lipophilic moieties at the N(3)- and/or in the 2'3'-O-position (3a-7a, 3c, 2c, 3b-7b) with the aim to improve the penetration and to achieve less side-effects due to higher lipophilicity (Malecki 2013, Köstler et al. 2013, Malecki et al. 2013b, Malecki et al. 2014, Malecki & Rosemeyer 2010, Rosemeyer, H., Malecki, E., Rosemeyer, H., Malecki, E., Werz, E., Korneev, S., Gall, K., Werz et al. 2013). Additionally, the 2'3'-O-Nonadecylidene derivative of uridine, 3c, was compounded for comparative reasons (Köstler et al. 2013).

This dissertation describes the *in vitro* testing of the drug delivery concept of the „lipid-nucleoside- and polysaccharide-conjugate of 5-FU (2a, 3a-7a, 3c, 2c, 3b-7b) towards three carcinoma cell lines HT-29 (human colon carcinoma), HepG2 (human hepatoblastoma), RENCA (murine renal adenocarcinoma) and on differentiated human THP-1 macrophages.

We incubated HT-29 cells for 24 h with ATTO 245[®]-conjugated substances (2c, 3b-7b) in order to find out, if the substances are able to pass the cell membrane and if so, in which cell compartment they were located after penetration.

All derivatives passed the cell membrane and accumulated in the cytoplasm, all avoiding the nuclei, except derivative 5-FUrd (2c), which showed a granulated distribution in the cytoplasm (Malecki et al. 2013a).

The impact of the absorption of the derivatives (3a-7a, 3c) on proliferation and apoptosis of the cells (in comparison with 5-FU (1) and 5-FUrd (2a)) set up priorities in this dissertation. After 24 h, 48 h or 72 h of incubation of HT-29 human colon carcinoma cells with the derivatives 1 (5-FU) (14-23%, 35-46% and 30-58%) or 2a (5-

FUrd) (33-45%, 60-67% and 58-67%) the survival of the cells was significantly decreased, in comparison to the negative control. Additionally, after 24 h treatment of the HT-29 cells at concentrations of 40 μ M and 80 μ M with the derivatives 3a (77% and 95%), 5a (30% and 86%) and 3c (89% and 96%) significantly reduced the viability of the HT-29 cells in comparison to the negative control. These three derivatives showed after 24 h of incubation of HT-29 cells at concentrations of 40 μ M and 80 μ M a significant reduction of the viability in comparison to the positive control (1) (61-81%, 73% and 80-82%), too. Incubation (48 h) of the HT-29 cells with the derivatives showed that four derivatives at concentrations of 40 μ M and 80 μ M significantly reduced the viability in comparison to 5-FU (~positive control): at the derivatives 3a (9-54%), 5a (5-48%), 7a (2-30%) and 3c (53-63%). Derivatives 4a and 6a did not affect the viability of the HT-29 cells.

The derivatives 3a, 5a, 7a and 3c also showed a significant decrease of viability in other cancer cell lines (RENCA and HepG2):

After 48 h of incubation of the RENCA cells, the derivatives 3a (51-57%) and 5a (56%) showed a significant decrease of viability compared to 5-FU. The derivative 3c (38-49%) and 7a (25-44%) revealed similar cytotoxic effects on the viability of RENCA cells like substance 1 (29-48%) and 2a (41-46%). After 48 h incubation of HepG2 cell lines, the derivatives 3a (72-75%), 5a (53%), 7a (43%) and 3c (22-74%) showed a significant decrease of viability in comparison to 5-FU.

Investigations of the derivatives using differentiated macrophages (THP1) were of major importance for the discrimination between cytotoxic- and side-effects. The derivative 5a showed a significant 6-27% increase of the viability in comparison to 5-FU (~positive control) after 48 h of incubation.

The ATTO 425[®]-conjugated derivatives 3b, 4b, 5b, 6b and 7b were tested regarding their anticancer activity in human HT-29 cells after 24 h and 48 h of treatment.

All of the derivatives lost their anticancer activity after conjugation with ATTO 425[®] at all concentrations under test (10-80 μ M) in comparison to the control. Using concentrations of 10-80 μ M only the ATTO 425[®]-conjugated derivative 5-FUrd (2c) showed a significant 31-52% or 41-57% reductions of the viability in comparison to the control.

Furthermore, we tested the impact of the derivatives on induction of apoptosis or proliferation in HT-29 cells after 1 h, 2 h, 4 h or 6 h of incubation in comparison to 5-FU (1) and 5-FUrd (2a). The derivative 5a showed the highest increase of apoptosis at a concentration of 80 μ M - after 2 h (3.1-fold), 4 h (3-fold) and 6 h (4-fold). After 6 h of

treatment at concentration 40 μ M a significant 3.3-fold increased apoptosis rate was observed.

Moreover, the effects of the treatment of HT-29 cells with the substances on gene signatures were part of the investigation. In real time PCR (qRT-PCR) the derivative 5a (40 μ M) showed a significant 2-fold increase of the tumor suppressor gene p53 expression compared to the negative and positive control (5-FU), and a 1.5-fold increased expression of the proapoptotic Caspase-3 gene.

This dissertation shows that the cytotoxicity of several derivatives of 5-FUrd (2a) was more effective than 5-FU, respectively, 5-FUrd using several cancer cell lines. Especially the derivative 5a is of major interest, because it has no cytotoxic effects on differentiated human macrophages (~ immune cell), despite of its high cytotoxic activity on several cancer cell lines. Thus, the derivative 5a could be a novel potential cytotoxic multipotent chemotherapeutic drug.

For the final assessment of the pharmacological/therapeutic potential, additional investigations, such as microtumors/-spheres, animal studies, and prospective clinical trials are needed.

9 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
5-FUrd	5-Fluorouridine
BRAF	proto-oncogene B-Raf
CH2THF	5,10-Methylentetrahydrofolat
DCC	deleted in colorectal carcinoma gene
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleotid
dTMP	Desoxythymidin Monophosphat
dUMP	Desoxythymidine Monophosphat
dUTP	Deoxyuridine Triphosphat
dUTPase	Deoxyuridine Triphosphat Pyrophosphatase
EGFR	epidermal growth factor receptor
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FdUMP	Fluorodeoxyuridine Monophosphat
FOLFIRI	5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan
FOLFOX	5-Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin
HNPCC	hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
IL8	Interleukin-8
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
KRK	Kolorektales Karzinom
LV	Leucovorin
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
P53	Tumorsuppressor p53
prä-mRNA	precursor messenger ribonucleic acid
qRT PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
snRNA	small nuclear ribonucleic acid
TME	totale mesorektale Exzision
tRNA	Transfer-RNA
TS	Thymidylate Synthase
UGD	Uracil-DNA Glykosylase

– Abkürzungsverzeichnis –

UICC	Union for International Cancer Control
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A
XELOX	Capecitabine, Oxaliplatin

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU; 1) (Duchinsky et al. 1957)	1
Abbildung 2: Mechanismus der Hemmung der Thymidylat Synthase (TS) durch 5-FU, CH ₂ THF= 5,10-Methylen tetrahydrofolat, dNTP= Deoxynucleotid, dTMP= Desoxythymidin Monophosphat, dUMP= Desoxythymidin Monophosphat, dUTP= Deoxyuridin Triphosphat, dUTPase= Deoxyuridin Triphosphat Pyrophosphatase, FdUMP= Fluorodeoxyuridin Monophosphat, UGD= Uracil-DNA Glykosylase (Longley et al. 2003)	2
Abbildung 3: Durchschnittliche Fallzahlen und altersspezifische Mortalitätsraten des kolorektalen Karzinoms (KRK) pro 100 000 nach Altersgruppen 2010-2012 (Becker & Holzmeier 2012)	4
Abbildung 4: Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2012	5
Abbildung 5: Staging beim KRK (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014)	9
Abbildung 6: TNM Klassifikation des KRK (UICC, 2010) (Herold 2015)	10
Abbildung 7: UICC-Klassifikation des KRK in Anlehnung an (Herold 2015)	10
Abbildung 8: Nachsorgeschema bei KRK im Stadium UICC II oder III (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014)	15
Abbildung 9: Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU; 1) und dessen Derivate 5-Fluorouridine (5-FUrd; 2a), und 2'-Deoxy-5-Fluorouridine (Floxuridine, 5-FdUrd; 2b) (Malecki et al. 2013a)	29
Abbildung 10: Struktur der 5-FUrd Derivate 3a–7a, sowie der ATTO 425®-kunjugierte 5-FUrd Derivate 3b–7b, und des Uridin Derivates 3c (Malecki et al. 2013a)	30
Abbildung 11: Fluorescence Spectral Viewer; Life Technologies (www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html)	33

Abbildung 12: Darstellung der RIN-Werte, Sample1: 4a, Sample 2: 6a, Sample 3: 3a, Sample 4: 5a, Sample 5: 7a, Sample 6: 5-FU (1), Sample 7: 2a, Sample 8: 3c, Sample 9: DMSO, Sample 10: Negativkontrolle, Sample 11: Doppelbestimmung von Substanz 5-FU (1), Sample 12: Doppelbestimmung der Negativkontrolle	36
Abbildung 13: Schematische Darstellung der PCR (Joppien, S. , Maier, S. , Wendling, D. 2011)	39
Abbildung 14 : Amplifikationskurven am Beispiel des Tumorsuppressor Tp53 Gens	40
Abbildung 15: Repräsentative Bilder der intrazellulären Lokalisation des ATTO 425®-konjugierten 5-FUrd (2c) und dessen Derivaten 4b und 5b in humanen HT-29-Zellen nach 24 h Inkubation, 200fache Vergrößerung. a) 2c, b) 4b, c) 5b (Malecki et al. 2013a)	42
Abbildung 16: Viabilität/Überleben humaner HT-29-Kolonkarzinomzellen nach 24 h (A) (Malecki et al. 2013a), nach 48 h (B) (Farhat et al. 2014) und nach 72 h (C) (Farhat et al. 2014) Inkubation mit 5-FU (1) (als Positivkontrolle), 5-FUrd (2a), bzw. dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in% Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p < 0,05$, ++: $p < 0,01$, +++: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=4	44
Abbildung 17: Viabilität/Überleben der humanen HT-29-Kolonkarzinomzellen nach 24 h (A) (Malecki et al. 2013a) und nach 48 h (B) Inkubation mit Atto 425®-konjugiertem 5-FUrd (2c) (als Positivkontrolle), und dessen Derivaten 3b, 4b, 5b, 6b, 7b und ATTO 425®. 1 x ATTO= nur ATTO 425® (als Kontrolle für die Derivate, an die ein ATTO 425® Molekül konjugiert wurde); 3 x ATTO= dreifache Konzentration des ATTO 425® (als Kontrolle für 5-FUrd (2c), an das drei ATTO 425® Moleküle gebunden wurden). Die Werte sind angegeben in% Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p < 0,05$, ++: $p < 0,01$, +++: $p < 0,001$ Signifikanzen vs. 5-FUrd (2c, Positivkontrolle). N=4	49

- Abbildung 18: Viabilität/Überleben der murinen RENCA-Zellen nach 48 h Inkubation mit 5-FU (1), 5-FUrd (2a), dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in% Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM.*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p<0,05$, ++: $p<0,01$, +++: $p<0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=4 (Farhat et al. 2014) 51
- Abbildung 19: Viabilität/Überleben der humanen HepG2-Zellen nach 48 h Inkubation mit 5-FU (1), 5-FUrd (2a), dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in% Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM.*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p<0,05$, ++: $p<0,01$, +++: $p<0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=4 (Farhat et al. 2014) 53
- Abbildung 20: Viabilität/Überleben der humanen THP-1-Makrophagen nach 48 h Inkubation mit 5-FU (1), und den Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, und 3c. Die Werte sind angegeben in% Viabilität der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium, 100% Viabilität), als Mittelwert \pm SEM.*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p<0,05$, ++: $p<0,01$, +++: $p<0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle). N=3 (Farhat et al. 2014) 55
- Abbildung 21: Effekte der Behandlung humaner HT-29-Zellen mit 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivaten 3a, 4a, 5a, 6a, 7a und 3c auf die Apoptose Rate nach (A) 1 h, (B) 2 h, (C) 4 h, oder (D) 6 h Inkubation. Die Werte (in% Apoptose) sind angegeben als Mittelwert \pm SEM.*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ Signifikanzen vs. Negativkontrolle (Medium alleine) und +: $p<0,05$, ++: $p<0,01$, +++: $p<0,001$ Signifikanzen vs. 5-FU (Positivkontrolle) N=3. (Farhat et al. 2014) 58
- Abbildung 22: HT-29-Zellen nach 6 h Inkubation mit 40 μ M 5-FU (1), gefärbt mit Hoechst 33342 (A) und YO-PRO®-1 (B) 59
- Abbildung 23: HT-29-Zellen nach 6 h Inkubation mit 40 μ M Derivat 5a in, gefärbt mit Hoechst 33342 (A) und YO-PRO®-1 (B) 59

Abbildung 24: Die mRNA Expression (gemessen mittels qRT-PCR) von A) Caspase-3, B) TP53 (p53), C) PCNA, D) BAX (Farhat et al. 2014) und E) IL-8 bestimmt nach 6-h Inkubation der humanen HT-29-Zellen mit 40 μ M 5-FU (1), 5-FUrd (2a) und dessen Derivaten 3a, 4, 5, 6, 7 und 3c. Die Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Kontrollwerte wurden als 1 gesetzt. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm SEM; N=3. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$ vs. Negativkontrolle; + : $p<0,05$ vs. 5-FU (1).	63
Abbildung 25: Aktivierung von p53 durch 5-FU (Longley et al. 2003)	70

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien	20
Tabelle 2: Liste der verwendeten Kits	21
Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer	22
Tabelle 4: Liste der verwendeten Zelllinien	23
Tabelle 5: Liste der verwendeten Einmalmaterialien	24
Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte	25
Tabelle 7: Liste der verwendeten Programme und Software	26
Tabelle 8: Versuchsaufbau des Viabilität-/Zytotoxizität-Assays	32
Tabelle 9: qRT-PCR: Thermalprofil	39

12 Literaturverzeichnis

- Aherne GW, Hardcastle A, Raynaud F, Jackman AL. 1996. Immunoreactive dUMP and TTP pools as an index of thymidylate synthase inhibition; effect of tomudex (ZD1694) and a nonpolyglutamated quinazoline antifolate (CB30900) in L1210 mouse leukaemia cells. *Biochemical pharmacology* 51 (10):1293–301
- Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, et al. 1998. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer research* 58 (6):1149–58
- Albert A, ed. 1985. *Selected Toxicity*. pp. 60, 125-126. London, New York: Chapman and Hall
- Alberts SR. 2012. Update on the optimal management of patients with colorectal liver metastases. *Critical reviews in oncology/hematology* 84 (1):59–70
- Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. 2007. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human reproduction (Oxford, England)* 22 (5):1304–09
- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine* 9 (45):145–52
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and Kolon cancer data sets. *Cancer research* 64 (15):5245–50
- André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, et al. 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for Kolon cancer. *The New England journal of medicine* 350 (23):2343–51
- Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. 1977. Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 25 (7):585–89
- Barillari P, Ramacciato G, Angelis R de, Gozzo P, Indinnimeo M, et al. 1990. Effect of preoperative Kolonoscopy on the incidence of synchronous and metachronous neoplasms. *Acta chirurgica Scandinavica* 156 (2):163–66
- Barone C. 2008. Adjuvant chemotherapy of Kolon cancer current strategies. *European Journal of Cancer Supplements* 6 (14):60–63

- Becker N, Holzmeier S. Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2012. Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
- Becker N, Holzmeier S. Durchschnittliche Fallzahlen und altersspez. Mortalitätsraten pro 100 000 nach Altersgruppen 2010-2012 (ICD 153, 154). Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen. In Sabine Holzmeier Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
- Becker N, Wahrendorf J. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, Springer, Berlin Heidelberg New York 1998, : Fortschreibung im Internet: www.krebsatlas.de. www.krebsatlas.de
- Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, et al. 2004. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II Kolon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (16):3408–19
- Bodner-Adler B, Bodner K, Zeisler H. 2007. Breast cancer diagnosed during pregnancy. *Anticancer research* 27 (3B):1705–07
- Bonaterra GA, Kelber O, Weiser D, Kinscherf R. 2013. Mechanisms of the anti-proliferative and anti-inflammatory effects of the herbal fixed combination STW 5 (Iberogast®) on Kolon adenocarcinoma (HT29) cells in vitro. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 20 (8-9):691–98
- Boncler M, Różalski M, Krajewska U, Podsędek A, Watala C. 2014. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 69 (1):9–16
- Bosch L, Harbers E, Heidelberger C. 1958. Studies on fluorinated pyrimidines. V. Effects on nucleic acid metabolism in vitro. *Cancer research* 18 (3):335–43
- Bourret LA, Goetinck PF, Hintz R, Rodan GA. 1979. Cyclic 3',5'-AMP changes in chondrocytes of the proteoglycan-deficient chick embryonic mutant, nanomelia. *FEBS letters* 108 (2):353–55
- Brat DJ, Bellail AC, Van Meir, Erwin G. 2005. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology* 7 (2):122–33
- Bull S, Langezaal I, Clothier R, Coecke S. 2001. A Genetically engineered cell-based system for detecting metabolism-mediated toxicity. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 29 (6):703–16

- Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, et al. 1999. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *The Journal of clinical investigation* 104 (3):263–69
- Busca A, Saxena M, Iqbal S, Angel J, Kumar A. 2014. PI3K/Akt regulates survival during differentiation of human macrophages by maintaining NF- κ B-dependent expression of antiapoptotic Bcl-xL. *Journal of leukocyte biology* 96 (6):1011–22
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 25 (2):169–93
- Carrato A. 2008. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR* 2 (4 Suppl):S42-6
- Chaudhuri NK, Montag BJ, Heidelberger C. 1958. Studies on fluorinated pyrimidines. III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-C¹⁴ and 5-fluoroorotic-2-C¹⁴ acid in vivo. *Cancer research* 18 (3):318–28
- Chen HS, Sheen-Chen SM. 2000. Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *Diseases of the Colon and rectum* 43 (8):1093–99
- Cheng M, He B, Wan T, Zhu W, Han J, et al. 2012. 5-Fluorouracil nanoparticles inhibit hepatocellular carcinoma via activation of the p53 pathway in the orthotopic transplant mouse model. *PloS one* 7 (10):e47115
- Chipuk JE, Green DR. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology* 18 (4):157–64
- Chu E, Voeller DM, Jones KL, Takechi T, Maley GF, et al. 1994. Identification of a thymidylate synthase ribonucleoprotein complex in human Colon cancer cells. *Molecular and cellular biology* 14 (1):207–13
- Chung DC, Rustgi AK. 1995. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 109 (5):1685–99
- Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz J, Angelis R de, et al. 2008. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet. Oncology* 9 (8):730–56
- Collins PD, Mpofu C, Watson AJ, Rhodes JM. 2006. Strategies for detecting Colon cancer and/or dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *The Cochrane database of systematic reviews* (2):CD000279

- Copur S, Aiba K, Drake JC, Allegra CJ, Chu E. 1995. Thymidylate synthase gene amplification in human Kolon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochemical pharmacology* 49 (10):1419–26
- Dannberg PB, Montag BJ, Heidelberger C. 1958. Studies on fluorinated pyrimidines. IV. Effects on nucleic acid metabolism in vivo. *Cancer research* 18 (3):329–34
- Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. 2002. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25 (12):1600–03
- Diasio RB, Harris BE. 1989. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical pharmacokinetics* 16 (4):215–37
- Doong SL, Dolnick BJ. 1988. 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro. *The Journal of biological chemistry* 263 (9):4467–73
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, et al. 2000. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355 (9209):1041–47
- Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, et al. 2014. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 25 (7):1346–55
- Duchinsky R, Plevin E, Heidelberger C. Synthesis of 5-fluoropyrimidines. *Journal of the American Chemical Society* 1957 (79):4559–60
- Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, Ura M, Hino A, et al. 1993. Cytokines induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make them more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 32 (5):333–38
- Falcone A, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, et al. FOLFOXIRI/bevacizumab (bev) versus FOLFIRI/bev as first-line treatment in unresectable metastatic colorectal cancer (mCRC) patients (pts): Results of the phase III TRIBE trial by GONO group [Abstract]. In ASCO Annual Meeting; 31 May-4 June 2013; Chicago, IL
- Farhat A, Malecki E, Bonaterra GA, Röthlein D, Wolf M, et al. 2014. Cytostatic/cytotoxic effects of 5-fluorouridine nucleolipids on Kolon, hepatocellular, and renal carcinoma cells: in vitro identification of a potential cytotoxic multi-anticancer drug. *Chemistry & biodiversity* 11 (3):469–82

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 136 (5):E359–86
- Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, et al. 1991. Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *Journal of gastroenterology and hepatology* 6 (4):325–44
- Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation* 10 (1):76–100
- Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology* 3 (3):153–73
- Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. 2008. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (4):689–90
- Furman PA, Fyfe JA, St Clair, M H, Weinhold K, Rideout JL, et al. 1986. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (21):8333–37
- Gallagher SR, Desjardins PR. 2008. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] Appendix 3:Appendix 4K*
- Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. 1999. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of combinatorial chemistry* 1 (1):55–68
- Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, et al. 2000. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (1):136–47

- Giovannucci E. 2002. Modifiable risk factors for Kolon cancer. *Gastroenterology clinics of North America* 31 (4):925–43
- Grogan BC, Parker JB, Guminski AF, Stivers JT. 2011. Effect of the thymidylate synthase inhibitors on dUTP and TTP pool levels and the activities of DNA repair glycosylases on uracil and 5-fluorouracil in DNA. *Biochemistry* 50 (5):618–27
- Haller DG, Tabernero J, Maroun J, Braud F de, Price T, et al. 2011. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III Kolon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (11):1465–71
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 18 (5):703–10
- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Dannbeg P, Mooren D, Griesbach L, et al. 1957. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179 (4561):663–66
- Heidelberger C, Griesbach L, Cruz O, Schnitzer RJ, Grunberg E. 1958. Fluorinated pyrimidines. VI. Effects of 5-fluorouridine and 5-fluoro-2'-deoxyuridine on transplanted tumors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 97 (2):470–75
- Herold G. 2015. *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. S. 488-496. Köln: Herold. 2015th ed.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11 (9):1026–30
- Hofheinz R, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, et al. 2012. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 13 (6):579–88
- Horton KM, Abrams RA, Fishman EK. 2000. Spiral CT of Kolon cancer: imaging features and role in management. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 20 (2):419–30
- Houghton JA, Tillman DM, Harwood FG. 1995. Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human Kolon

- carcinoma cells to thymineless death. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1 (7):723–30
- Idziorek T, Estaquier J, Bels F de, Ameisen JC. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal of immunological methods* 185 (2):249–58
- Isbert C, Germer C. 2012. Bedeutung der Endoskopie und Endosonographie für das lokale Staging beim Rektumkarzinom. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen* 83 (5):430–38
- Ishii T, Marumo K. 2004. Biochemical modulation of 5-fluorouracil with interferon alpha/beta and gamma on murine renal cell carcinoma. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 11 (11):993–1000
- Jackson, R. C. & Grindley, G. B., ed. 1984. *The Biochemical Basis for Methotrxate Cytotoxicity*. 289-315. New York: Academic
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. 2010. Hereditary and familial Kolon cancer. *Gastroenterology* 138 (6):2044–58
- Jemal A, Bray F, Center mm, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61 (2):69–90
- Johns LE, Houlston RS. 2001. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American journal of gastroenterology* 96 (10):2992–3003
- Johnston PG, Drake JC, Trepel J, Allegra CJ. 1992. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer research* 52 (16):4306–12
- Johnston PG, Kaye S. 2001. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anti-cancer drugs* 12 (8):639–46
- Joppien S, Maier S, Wendling D. 2011. Anlehnung an: Basics experimentelle Doktorarbeit. S. 59. München: Elsevier, Urban u. Fischer. 1. Aufl
- Kahi CJ, Imperiale TF, Juliar BE, Rex DK. 2009. Effect of screening Kolonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 7 (7):770-5; quiz 711
- Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Gotoh O, Seno T, Ayusawa D. 1990. Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *The Journal of biological chemistry* 265 (33):20277–84
- Khosravi Shahi P, Díaz Muñoz de la Espada, V M, García Alfonso P, Encina García S, Izarzugaza Perón Y, et al. 2007. Management of gastric adenocarcinoma. *Clinical*

- & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 9 (7):438–42
- Kirke R, Rajesh A, Verma R, Bankart, Michael J G. 2007. Rectal cancer: incidence of pulmonary metastases on thoracic CT and correlation with T staging. *Journal of computer assisted tomography* 31 (4):569–71
- Kish JA, Wolf M, Crawford ED, Leimert JT, Bueschen A, Neefe JR, Flanigan RC. 1994. Evaluation of low dose continuous infusion 5-fluorouracil in patients with advanced and recurrent renal cell carcinoma. A Southwest Oncology Group Study. *Cancer* 74 (3):916–19
- Kodama Y, Fumoto S, Nishi J, Nakashima M, Sasaki H, Nakamura J, Nishida K. 2008. Absorption and distribution characteristics of 5-fluorouracil (5-FU) after an application to the liver surface in rats in order to reduce systemic side effects. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31 (5):1049–52
- Köstler K, Werz E, Malecki E, Montilla-Martinez M, Rosemeyer H. 2013. Nucleoterpene of thymidine and 2'-deoxyinosine: synthons for a biomimetic lipophilization of oligonucleotides. *Chemistry & biodiversity* 10 (1):39–61
- Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, et al. 1991. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *The New England journal of medicine* 324 (11):709–15
- Kufe DW, Major PP. 1981. 5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 256 (19):9802–05
- Kurokawa M, Kornbluth S. 2009. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138 (5):838–54
- Kwok SP, Lau WY, Leung KL, Liew CT, Li AK. 1996. Prospective analysis of the distal margin of clearance in anterior resection for rectal carcinoma. *The British journal of surgery* 83 (7):969–72
- Kyle SM, Isbister WH, Yeong ML. 1991. Presentation, duration of symptoms and staging of colorectal carcinoma. *The Australian and New Zealand journal of surgery* 61 (2):137–40
- Labianca R, Marsoni S, Pancera G, Torri V, Zaniboni A (GIVIO, Italy), Erlichman C, Pater J, Shepherd L, Zee B (NCIC-CTG, Canada), Seitz J F, Milan C, Pignon J P (FFCD, France). (Hrsg.) 1995. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in Kolon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Kolon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 345 (8955):939–44

- Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, et al. 1999. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nature medicine* 5 (9):1071–75
- Lan Y, Yang S, Chang S, Liang W, Li AF, et al. 2012. Analysis of the seventh edition of American Joint Committee on Colon cancer staging. *International journal of colorectal disease* 27 (5):657–63
- Larsson SC, Wolk A. 2006. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 119 (11):2657–64
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe). S3 - Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurz version 1. 1 , 2014, AW MF Registrierungsnummer: 021 - 007 OL, [Stand:01.08.2014]
- Lévy E, Piedbois P, Buyse M, Pignon JP, Rougier P, et al. 1998. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16 (11):3537–41
- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (6):3369–76
- Liang J, Huang K, Cheng Y, Hsu H, Cheng A, et al. 2002. P53 overexpression predicts poor chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV colorectal cancers after palliative bowel resection. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 97 (4):451–57
- Lindahl T. 1974. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (9):3649–53
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews* 46 (1-3):3–26
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, et al. 2006. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer.

- Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24 (33):5313–27
- Lombardi L, Morelli F, Cinieri S, Santini D, Silvestris N, et al. 2010. Adjuvant Kolon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go. Cancer treatment reviews 36 Suppl 3:S34-41
- Longley DB, Boyer J, Allen WL, Latif T, Ferguson PR, et al. 2002. The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. Cancer research 62 (9):2644–49
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature reviews. Cancer 3 (5):330–38
- Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, Masi G, Sensi E, et al. 2014. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. European journal of cancer (Oxford, England : 1990) 50 (1):57–63
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 74 (6):957–67
- Macrae FA, St John, D J. 1982. Relationship between patterns of bleeding and Hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas. Gastroenterology 82 (5 Pt 1):891–98
- Mader RM, Kalipciyan M, Ohana P, Hochberg A, Steger GG. 2011. Suicide activation in a 5-fluorouracil resistant Kolon cancer model in vitro. International journal of clinical pharmacology and therapeutics 49 (1):69–70
- Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. 1999. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. The American journal of gastroenterology 94 (10):3039–45
- Malecki E. 2013. Nucleolipids and Lipo-Oligonucleotides of 5-Fluorouridine: Synthesis, Biological Applications and Immobilization. Osnabrück
- Malecki E, Farhat A, Bonaterra GA, Röthlein D, Wolf M, et al. 2013a. Synthesis of 5-fluorouridine nucleolipid derivatives and their cytostatic/cytotoxic activities on human HT-29 Kolon carcinoma cells. Chemistry & biodiversity 10 (12):2235–46
- Malecki E, Ottenhaus V, Werz E, Knies C, Montilla Martinez M, Rosemeyer H. 2014. Nucleolipids of the cancerostatic 5-fluorouridine: synthesis, adherence to oligonucleotides, and incorporation in artificial lipid bilayers. Chemistry & biodiversity 11 (2):217–32

- Malecki E, Rosemeyer H. 2010. O-2', 3'-Ketal-Nucleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity, and Acidic Stability. *Helvetica Chimica Acta* (93 (8)):1500–12
- Malecki E, Viere R, Rosemeyer H. 2013b. Immobilization of 5-fluorouridine on chitosan. *Chemistry & biodiversity* 10 (10):1828–41
- Marin-Vicente C, Lyutvinskiy Y, Romans Fuertes P, Zubarev RA, Visa N. 2013. The effects of 5-fluorouracil on the proteome of Kolon cancer cells. *Journal of proteome research* 12 (4):1969–79
- Mekenkamp, L J M, Koopman M, Teerenstra S, van Krieken, J H J M, Mol L, Nagtegaal ID, Punt, C J A. 2010. Clinicopathological features and outcome in advanced colorectal cancer patients with synchronous vs metachronous metastases. *British journal of cancer* 103 (2):159–64
- Miret S, De Groene, Els M, Klaffke W. 2006. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *Journal of biomolecular screening* 11 (2):184–93
- Miyashita T, Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80 (2):293–99
- Moiel D, Thompson J. 2011. Early detection of Kolon cancer-the kaiser permanente northwest 30-year history: how do we measure success? Is it the test, the number of tests, the stage, or the percentage of screen-detected patients? *The Permanente journal* 15 (4):30–38
- Moskal A, Norat T, Ferrari P, Riboli E. 2007. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 120 (3):664–71
- Nagtegaal ID, van de Velde, Cornelius J H, Marijnen, Corrie A M, van Krieken, Jan H J M, Quirke P. 2005. Low rectal cancer: a call for a change of approach in abdominoperineal resection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (36):9257–64
- Naguib A, Gay L J, Arends M J, Mitrou P N. 2012. *The Molecular Genetic Events in Coorectal Cancer and Diet: INTECH Open Access Publisher*
- Neri E, Giusti P, Battolla L, Vagli P, Boraschi P, et al. 2002. Colorectal cancer: role of CT Kolonography in preoperative evaluation after incomplete Kolonoscopy. *Radiology* 223 (3):615–19

- Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, et al. 1998. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human Kolon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British journal of cancer* 78 (8):986–92
- Noffsinger AE. 2009. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual review of pathology* 4:343–64
- Noor F, Kinscherf R, Bonaterra GA, Walczak S, Wölfl S, Metzler-Nolte N. 2009. Enhanced cellular uptake and cytotoxicity studies of organometallic bioconjugates of the NLS peptide in Hep G2 cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10 (3):493–502
- Nordlinger B, van Cutsem E, Gruenberger T, Glimelius B, Poston G, et al. 2009. Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendations from an expert panel. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20 (6):985–92
- Nussbaum N, Altomare I. 2015. The neoadjuvant treatment of rectal cancer: a review. *Current oncology reports* 17 (3):434
- O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. 2004. Kolon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute* 96 (19):1420–25
- Palmqvist R, Engarås B, Lindmark G, Hallmans G, Tavelin B, et al. 2003. Prediagnostic levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 in colorectal cancer: a matched case-control study. *Diseases of the Kolon and rectum* 46 (11):1538–44
- Park J, Collins JM, Gazdar AF, Allegra CJ, Steinberg SM, Greene RF, Kramer BS. 1988. Enhancement of fluorinated Pyrimidine-Induced Cytotoxicity by Leucovorin in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 80 (19):1560–64
- Patton JR. 1993. Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry* 32 (34):8939–44
- Peters GJ, ed. 1995. *Oxford Textbook of Oncology, Antimetabolites*. pp. 524-552. Oxford
- Pettersen HS, Visnes T, Vågbø CB, Svaasand EK, Doseth B, et al. 2011. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic acids research* 39 (19):8430–44

- Pox CP, Altenhofen L, Brenner H, Theilmeyer A, Stillfried D von, Schmiegel W. 2012. Efficacy of a nationwide screening Kolonoscopy program for colorectal cancer. *Gastroenterology* 142 (7):1460-7.e2
- Redman CM, Avellino G, Yu S. 1983. Secretion of proalbumin by canavanine-treated Hep-G2 cells. *The Journal of biological chemistry* 258 (6):3446–52
- Rosemeyer H, Malecki E., Eur. Pat. Appl. EP 12 186 564.6, 2012,
- Rosemeyer H, Malecki E, Werz E, Korneev S, Gall K. Eur. Pat. Appl. EP 12 186 576.0, 2012
- Rutkowski A, Bujko K, Nowacki MP, Chmielik E, Nasierowska-Guttmejer A, Wojnar A. 2008. Distal bowel surgical margin shorter than 1 cm after preoperative radiation for rectal cancer: is it safe? *Annals of surgical oncology* 15 (11):3124–31
- Rutman RJ, Cantarow A, Paschkis KE. 1954. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer research* 14 (2):119–23
- Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, et al. 2008. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (12):2013–19
- Salup RR, Herberman RB, Wiltout RH. 1985. Role of natural killer activity in development of spontaneous metastases in murine renal cancer. *The Journal of urology* 134 (6):1236–41
- Santi DV, Hardy LW. 1987. Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26 (26):8599–606
- Santi DV, McHenry CS, Sommer H. 1974. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 13 (3):471–81
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. 2004. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England journal of medicine* 351 (17):1731–40
- Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. 1993. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ (Clinical research ed.)* 306 (6880):752–55
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, et al. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7:3

- Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. 2000. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *The Journal of biological chemistry* 275 (10):7337–42
- Sengupta S, Tjandra JJ. 2001. Local excision of rectal cancer: what is the evidence? *Diseases of the Colon and rectum* 44 (9):1345–61
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. 2009. TNM classification of malignant tumours. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. 7th ed
- Sommer H, Santi DV. 1974. Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methylenetetrahydrofolate. *Biochemical and biophysical research communications* 57 (3):689–95
- Soni SD, Srikrishnan T. 2004. Crystal structure and conformation of 5-fluorouridine: conformational preferences for 5-fluorinated pyranosides. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 23 (11):1779–95
- Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, Rappaport ES, Helbert B, Riggs M. 1991. Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestations. *Southern medical journal* 84 (5):575–78
- Spirio LN, Samowitz W, Robertson J, Robertson M, Burt RW, Leppert M, White R. 1998. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to Kolon polyps. *Nature genetics* 20 (4):385–88
- Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, Walsh MD, Whitehall VL, et al. 2006. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing Kolonoscopy. *Gastroenterology* 131 (5):1400–07
- Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Hörmann K, Kinscherf R, Goessler UR. 2009. Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC molecular biology* 10:66
- Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. 2006. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer* 107 (5 Suppl):1128–41
- Stintzing S. 2014. Management of colorectal cancer. *F1000prime reports* 6:108
- Swain SM, Lippman ME, Egan EF, Drake JC, Steinberg SM, Allegra CJ. 1989. Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 7 (7):890–99

- Sykes ML, Avery VM. 2009. Development of an Alamar Blue viability assay in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei* bloodstream form strain 427. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81 (4):665–74
- Tang X, Zhu Y, Tao W, Wei B, Lin X. 2007. Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on Kolon carcinoma. *Postgraduate medical journal* 83 (979):338–43
- Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, et al. 2004. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (2):229–37
- Tournigand C, Cervantes A, Figer A, Lledo G, Flesch M, et al. 2006. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-Go fashion in advanced colorectal cancer--a GERCOR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (3):394–400
- van Cutsem E, Köhne C, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, et al. 2011. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (15):2011–19
- van der Harst, M R, Bull S, Laffont CM, Klein WR. 2005. Gentamicin nephrotoxicity--a comparison of in vitro findings with in vivo experiments in equines. *Veterinary research communications* 29 (3):247–61
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, et al. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* 319 (9):525–32
- Wang H, Jiang H, Zhou M, Xu Z, Liu S, et al. 2009. Epidermal growth factor receptor VIII enhances tumorigenicity and resistance to 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* 279 (1):30–38
- Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD. 2010. KRAS mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine. *Advances in anatomic pathology* 17 (1):23–32

- Wang W, Yang Y, Zhao Y, Zhang T, Liao Q, Shu H. 2014. Recent studies of 5-fluorouracil resistance in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 20 (42):15682–90
- Weeks JC, Catalano PJ, Cronin A, Finkelman MD, Mack JW, Keating NL, Schrag D. 2012. Patients' expectations about effects of chemotherapy for advanced cancer. *The New England journal of medicine* 367 (17):1616–25
- Weinreich J, Schott S, Königsrainer I, Zieker D, Königsrainer A, Schott H. 2011. Cytostatic activity of the duplex drug linking 2'-deoxy-5-fluorouridine (5FdU) with 3'-C-ethynylcytidine (ECyd) against gastric adenocarcinoma cell lines. *Investigational new drugs* 29 (6):1294–302
- Weinreich J, Schott TC, Königsrainer I, Küper M, Königsrainer A, Schott H. 2012. Cytostatic activity of a 5-fluoro-2'-deoxyuridine-alendronate conjugate against gastric adenocarcinoma and non-malignant intestinal and fibroblast cell lines. *Anticancer research* 32 (10):4299–305
- Werz E, Viere R, Gassmann G, Korneev S, Malecki E, Rosemeyer H. 2013. Synthesis of Thymidine, Uridine, and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides. *HCA* 96 (5):872–88
- West NP, Anderin C, Smith, K J E, Holm T, Quirke P. 2010. Multicentre experience with extralevator abdominoperineal excision for low rectal cancer. *The British journal of surgery* 97 (4):588–99
- Wettergren Y, Carlsson G, Odin E, Gustavsson B. 2012. Pretherapeutic uracil and dihydrouracil levels of colorectal cancer patients are associated with sex and toxic side effects during adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Cancer* 118 (11):2935–43
- Willet CG, Badizadegan K, Ancukiewicz M, Shellito PC. 1999. Prognostic factors in stage T3N0 rectal cancer: do all patients require postoperative pelvic irradiation and chemotherapy? *Diseases of the Colon and rectum* 42 (2):167–73
- Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM. 2008. p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell research* 18 (7):733–44
- Wolpin BM, Mayer RJ. 2008. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134 (5):1296–310
- Wright FC, Lookhong N, Urbach D, Davis D, McLeod RS, Gagliardi AR. 2009. Multidisciplinary cancer conferences: identifying opportunities to promote implementation. *Annals of surgical oncology* 16 (10):2731–37

- Wright JE, Dreyfuss A, el-Magharbel I, Trites D, Jones SM, et al. 1989. Selective expansion of 5,10-methylenetetrahydrofolate pools and modulation of 5-fluorouracil antitumor activity by leucovorin in vivo. *Cancer research* 49 (10):2592–96
www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html
- Wyatt MD, Wilson DM. 2009. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66 (5):788–99
- Xie K. 2001. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & growth factor reviews* 12 (4):375–91
- Yamada M, Nakagawa H, Fukushima M, Shimizu K, Hayakawa T, Ikenaka K. 1998. In vitro study on intrathecal use of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) for meningeal dissemination of malignant brain tumors. *Journal of neuro-oncology* 37 (2):115–21
- Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O, Koyama Y, Hirota Y, et al. 1987. Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *The Journal of biological chemistry* 262 (17):8235–41
- Zeng Y, Yang Z, Guo X, Jun W, Dong W. 2014. Synergistic effect of puerarin and 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma. *Oncology letters* 8 (6):2436–42
- Zhang W, Ramdas L, Shen W, Song SW, Hu L, Hamilton SR. 2003. Apoptotic response to 5-fluorouracil treatment is mediated by reduced polyamines, non-autocrine Fas ligand and induced tumor necrosis factor receptor 2. *Cancer biology & therapy* 2 (5):572–78
- Zhang ZG, Harstrick A, Rustum YM. 1992. Modulation of fluoropyrimidines: role of dose and schedule of leucovorin administration. *Seminars in oncology* 19 (2 Suppl 3):10–15
- Zhao L, Sha Y, Zhao Q, Yao J, Zhu B, et al. 2013. Enhanced 5-fluorouracil cytotoxicity in high COX-2 expressing hepatocellular carcinoma cells by wogonin via the PI3K/Akt pathway. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 91 (4):221–29
- Zhu AX. 2006. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should we be? *The oncologist* 11 (7):790–800

13 Veröffentlichungen

Malecki E¹⁾, **Farhat A**¹⁾, Bonaterra G A, Röthlein D, Wolf M, Schmitt J, Kinscherf R and Rosemeyer H, 2013. Synthesis of 5-fluorouridine nucleolipid derivatives and their cytostatic/cytotoxic activities on human HT-29 Kolon carcinoma cells. *Chemistry & biodiversity* 10, 12, 2235–2246

Farhat A¹⁾, Malecki E¹⁾, Bonaterra G A, Röthlein D, Wolf M, Schmitt J, Rosemeyer H and Kinscherf R, 2014. Cytostatic/cytotoxic effects of 5-fluorouridine nucleolipids on Kolon, hepatocellular, and renal carcinoma cells: in vitro identification of a potential cytotoxic multi-anticancer drug. *Chemistry & biodiversity* 11, 3, 469–482

¹⁾ These authors contributed equally to this work./ Geteilte Erstautorenschaft

14 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Bartsch, Baum, Becker, K., Becker, S., Bein, Berger, Bien, Bösner, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Eikmann, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gress, Grosse, Hertl, Heverhagen, Hilt, Hofmann, Hoyer, Jacques, Kinscherf, Kircher, Koolmann, Kruse, Lill, Löffler, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Moll, Moosdorf, Müller, Neff, Neubauer, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Renz, Richter, Roehm, Ruchholtz, Sahlmand, Schieffer, Schneider, Sekundo, Thieme, Tritz, Vogelmeier, Werner, Wulf, Zovko

in Laufenburg: Abitabile, in Frankenberg: Assmann, Dylla, Ludolph, Pryss

15 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof Dr. Kinscherf bedanken für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und für die umfangreiche Begleitung und Begutachtung meiner Arbeit.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Dr. Gabriel Bonaterra, der allzeit für Fragen und Probleme eine Lösung parat hatte und für die intensive und sehr gute Betreuung meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Andrea Cordes, Frau Anne Henkeler und Frau Claudia Keppler für den Rat und die herzliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Besonders möchte ich meiner Familie, Jonathan und meinen Freunden danken für die Unterstützung bei der Promotion und während der gesamten Studienzeit. Ohne sie wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.